

Aus dem Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

In vivo Analyse der synovialen Mikrozirkulation-
Charakterisierung und Einfluß von Antileukoproteinase nach
Arthritisinduktion in der Maus



Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Anja Erichson

aus Rostock

Rostock, den 28.12.2009

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar
Institut für Experimentelle Chirurgie und Zentrale Versuchstierhaltung, Universität Rostock
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. habil. Wolfram Mittelmeier
Orthopädische Klinik und Poliklinik, Universität Rostock
3. Gutachter: Herr Prof. Dr. Rolf Bräuer
Institut für Pathologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena

Tag der Verteidigung: 14.07.2010

Inhalt

1.	Zusammenfassung	1
2.	Summary	3
3.	Einleitung	5
3.1.	Rheumatoide Arthritis	5
3.2.	Synoviale Mikrozirkulation	9
3.3.	Tiermodelle	12
3.4.	Antileukoproteinase	16
3.5.	Zielsetzung	18
4.	Material und Methodik	19
4.1.	Versuchsabschnitt I	19
4.1.1.	Versuchstiere	19
4.1.2.	Modelle	20
4.2.	Versuchsabschnitt II	21
4.2.1.	Versuchstiere	21
4.2.2.	Modell	21
4.2.3.	Rekombinante Antileukoproteinase	22
4.3.	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie zur Analyse der Mikrozirkulation der Synovialschleimhaut des Kniegelenkes	23
4.3.1.	Mikrozirkulationsmodell des Kniegelenkes	23
4.3.2.	Aufbau der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie	23
4.3.3.	Mikrozirkulatorische Analyse	25
4.4.	Experimenteller Aufbau	28
4.4.1.	Vorbehandlung der Mäuse-Versuchsabschnitt I	28
4.4.2.	Vorbehandlung der Mäuse-Versuchsabschnitt II	29
4.4.3.	Versuchsablauf und mikrochirurgische Interventionen	30
4.5.	Blutuntersuchung	32
4.6.	Klinische Evaluation der Arthritis	32
4.7.	Histologie	32
4.8.	Statistik	33

5.	Ergebnisse	34
5.1.	Versuchsabschnitt I	34
5.1.1.	Mikrozirkulation der Kniegelenke von arthritischen Mäusen	34
5.1.2.	Klinischer Score	38
5.1.3.	Blutanalyse	39
5.1.4.	Histologischer Score	39
5.2.	Versuchsabschnitt II	40
5.2.1.	Mikrozirkulation der Kniegelenke von arthritischen Mäusen mit Antileukoproteinase-Vorbehandlung	40
5.2.2.	Klinischer Score	44
5.2.3.	Blutanalyse	45
5.2.4.	Histologischer Score	46
5.3.	Zusammenfassung der Ergebnisse	47
6.	Diskussion	49
6.1.	Diskussion der Methoden	49
6.1.1.	Kollagen-induzierte Arthritis	50
6.1.2.	Anti-Kollagen Typ II Antikörper-induzierte Arthritis	52
6.1.3.	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie und chirurgische Interventionen	55
6.2.	Diskussion der Ergebnisse	59
6.2.1.	Rolle der Mikrozirkulation in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis	59
6.2.2.	Effektivität von Antileukoproteinase in der Behandlung der rheumatoiden Arthritis	65
7.	Quellen und Literaturangaben	73
8.	Lebenslauf	96
9.	Danksagung	98

Anhang

Thesen zur Dissertation

Eidesstattliche Erklärung

Glossar

%	Prozent von Hundert
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AIA	Antigen-induzierte Arthritis
ALP	Antileukoproteinase
CII	Kollagen II
ca.	circa
CAIA	Anti-Kollagen II Antikörper-induzierte Arthritis
CFA	Komplettes Freund'sches Adjuvans
CIA	Kollagen-induzierte Arthritis
CRP	C-reaktives Protein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii, und andere
FCD	funktionelle Kapillardichte
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
h	Stunden
HLA	Humanes leukozytäres Antigen
ICAM-1	Intercellular Cell Adhesion Molecule-1
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IL	Interleukin
IVM	intravitale Fluoreszenzmikroskopie
kg	Kilogramm
kd	Kilodalton
KG	Körpergewicht
LFA	Lymphocyte function-associated antigen
LPS	Lipopolysaccharide
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
MHC	Major Histokompatibilität Komplex
mm	Millimeter

µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
mind.	mindestens
n	Number, Anzahl
NaCl	Kochsalzlösung
NF-κB	nuclear factor kappa B
nm	Nanometer
p	statistisches Signifikanzniveau
PECAM	Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule
PBS	Phosphate buffered Saline
pH	pH-Wert
RA	Rheumatoide Arthritis
vRBC	venuläre Erythrozytengeschwindigkeit
s	Sekunden
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
sog.	sogenannten
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell Rezeptor
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor-α
u.a.	unter anderem
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
vs.	versus
W	Watt
z.B.	zum Beispiel

1. Zusammenfassung

Die rheumatoide Arthritis (RA) stellt mit einer Prävalenz von ca. 1-2% die häufigste chronisch entzündliche Gelenkerkrankung dar. Durch den chronischen Charakter und die fehlenden kurativen Behandlungsmöglichkeiten schreitet die Arthritis voran und ist mit einem großen Leidensdruck für den Patienten verbunden. In schweren Verlaufsformen führt die RA bereits nach kurzer Dauer zu Invalidität und Arbeitsunfähigkeit des Betroffenen.

Ätiologie und Pathogenese der Erkrankung werden im Kreise der Autoimmunerkrankungen diskutiert, sind aber trotz intensiver Forschung noch weitgehend unklar. Schlüsselpunkt der Pathogenese ist die Entzündung der Synovialis. Die resultierende Synovialitis ist Ausgangspunkt eines invasiv und aggressiv wachsenden Gelenkpannus. Die synoviale Mikrozirkulation und im Besonderen das Gefäßendothel nimmt durch die Funktionen der Zytokinproduktion, Antigenpräsentation sowie Leukozytenrekrutierung eine zentrale Stellung ein und ist entscheidend an der Entstehung und Progression des entzündlichen Prozesses beteiligt.

Ziel der in vivo Studie war zunächst, die synoviale Mikrozirkulation des Kniegelenkes mittels hochauflösender Multifluoreszenz-Mikroskopie in zwei murinen Arthritismodellen während der frühen Entwicklungsphase zu charakterisieren. In einem nächsten Schritt galt es, die therapeutische Wirksamkeit rekombinant-hergestellter humaner Antileukoprotease (ALP), einem physiologischen Inhibitor granulozytärer Serinproteasen, nach Arthritisinduktion intravitalmikroskopisch zu untersuchen.

Im ersten Versuchsabschnitt wurde die Kollagen-induzierte Arthritis (CIA) in verschiedenen Mausstämmen angewandt. Die Immunisierung der FVB/NJ, TCR und DBA1/J Mäuse (n=48) erfolgte durch eine intradermale Kollagenapplikation (125 µg Kollagen). Des Weiteren wurde das Modell der Anti-Kollagen II Antikörper-induzierten Arthritis (CAIA) genutzt. DBA1/J Mäuse (n=16) erhielten ein Gemisch aus zwei monoklonalen Antikörpern gegen Kollagen II (CAIA, 750µg K-mAb), welches i.v. über die Schwanzvene appliziert wurde. Sechs Wochen nach Kollagenimmunisierung bzw. 24 Stunden nach Antikörperexposition wurden die Tiere narkotisiert (Ketamin/Xylazin-Anästhesie 90mg/25mg pro kg/KG) und die Synovialis des Kniegelenkes nach Durchtrennung der Patellarsehne für die Fluoreszenzmikroskopie exponiert. Trotz Abwesenheit klinisch erfassbarer, arthritischer Gelenkveränderungen trat in den suszeptiblen Mausstämmen (TCR, DBA1/J) nach Arthritisinduktion eine massive zelluläre Immunantwort, einhergehend mit gesteigerter Leukozyten-Endothelzell-Interaktion, auf.

Kontrolltiere, welche mit äquimolaren Volumen Komplettes Freund'sches Adjuvans (CFA) bzw. "phosphate buffered saline" (PBS) behandelt wurden, sowie der Arthritis-resistente Mausstamm FVB/NJ zeigten statistisch signifikant niedrigere inflammatorische Zellinteraktionen. Die synoviale Blutzellfließgeschwindigkeit war nach Arthritisinduktion im Vergleich zu den Kontrollbedingungen reduziert.

Das Ziel des zweiten Versuchsabschnitts war die Analyse der therapeutischen Wirksamkeit von ALP im Modell der CAIA. Konkordant zum Versuchsabschnitt I wurden DBA1/J Mäuse (n=56) durch Injektion eines Anti-Kollagen Antikörper-Cocktails (i.v.) immunisiert. Zeitgleich zur Antikörper-Exposition erhielten die Tiere ALP i.p. in unterschiedlicher Dosierung (100µg oder 300µg). Als Kontrolle dienten Tiere, welche nur die Trägerlösung PBS in äquivalenten Volumina erhielten. Zu allen untersuchten Zeitpunkten, d.h. nach 6, 24 und 72 Stunden, konnte ALP die gesteigerte Leukozyten-Endothelzell-Interaktion nach Antikörper-Exposition signifikant reduzieren. Der blockierende Effekt von ALP auf die Leukozyteninteraktion mit der Gefäßwandintima bezog sich sowohl auf das Rolling als auch auf die feste Adhäsion. Im Vergleich zur Standarddosis von 100µg ALP zeigte die Dosissteigerung auf 300µg keine Zunahme der leukozytären Hemmung. Auffällig war nach ALP-Behandlung, vor allem nach Applikation von 300µg ALP, eine Reduktion der Blutzellfließgeschwindigkeit und der funktionellen Kapillardichte.

In der vorliegenden Arbeit konnte intravitalmikroskopisch in zwei etablierten und vielgenutzten Arthritismodellen eindrucksvoll die Entzündungsreaktion der synovialen Kniegelenksschleimhaut noch vor dem Auftreten einer klinischen Symptomatik gezeigt werden. Weiterhin konnten wir in einem Antikörper-induzierten Arthritismodell zeigen, dass die Applikation von ALP die synoviale Entzündungsreaktion, welche mit einer gesteigerten Leukozyten-Endothelzell-Interaktion einhergeht, während der frühen Arthritisphase effektiv vermindert. ALP könnte eine vielversprechende und neue Therapieoption zur Blockade der Leukozytenextravasation in der Behandlung von Gelenkentzündungen darstellen, zumal ALP aufgrund des niedrigen Molekulargewichtes (11kd) und seiner kationischen Natur präferentiell im Knorpel akkumuliert und dort zusätzlich proteaseinhibitorische Schutzwirkungen erfüllen kann.

2. Summary

With a prevalence of 1-2%, rheumatoid arthritis (RA) represents the most common inflammatory joint disease. Because of its chronic character and the lack of curative therapies RA proceeds and leads to disability even in younger.

The aetiology and pathogenesis of this disease are discussed as an autoimmune disease however, despite intensive investigations the exact mechanisms remain unclear. The crucial point of the pathogenesis is the synovial inflammation resulting in an invasively and aggressively growing pannus tissue. The vascular endothelium and the microcirculation, including cytokine production, antigen presentation and leukocyte-endothelial cell interactions play a significant role during the initiation and progress of this inflammatory process.

The aim of the present in vivo study was to characterize the synovial microcirculation of the knee joint using high resolution multifuorescence microscopy in two murine arthritis models. The second step was to evaluate the therapeutic efficacy of recombinant human antileukoproteinase (ALP), a physiological inhibitor of granulocytic serine proteases, after induction of arthritis.

First, we used the models of collagen-induced arthritis (CIA) and the anti-collagen II antibody-induced arthritis (CAIA). FVB/NJ, TCR and DBA1/J mice were immunized (n=56) either by intradermal bovine collagen-application (CIA, 125µg Collagen) or by i.v. injection of two monoclonal antibodies against collagen II (CAIA, 750µg m-Ab). Early after immunization the mice were anesthetized (ketamin/xylazin-anaesthesia 90/25mg pro/kg body weight) and the synovial tissue of the knee joint was microsurgically exposed by a transversal cut of the patella tendon for subsequent fluorescence microscopy. Although clinical signs of arthritis disease could not be observed in the joints, induction of arthritis caused a massive inflammatory cell response in susceptible mouse strains (TCR, DBA1/J), associated with enhanced leukocyte-endothelial cell interactions. Control mice pretreated with equivalent volumes of complete Freund's adjuvant (CFA) or "phosphate buffered saline" (PBS) as well as the arthritis resistant mousestrain FVB/NJ showed statistical significantly reduced inflammatory cell interactions. Furthermore venular red blood cell velocity showed marked reduction during the initiation of arthritis in comparison with control conditions.

To analyze the therapeutic effect of ALP, the CAIA was induced in DBA1/J mice (n=56) by injection of an antibody-cocktail. At the same time animals received an i.p. injection of ALP

(100µg/300µg). Equal volumes of phosphate buffered saline (PBS) were used in control animals. At all observation time points, ie. after 6, 24 or 72 hours, the antibody-exposure caused a massive synovial inflammation with increased leukocyte-endothelial cell interaction that could markedly be suppressed by pretreatment with ALP. This blocking effect of ALP was observed in both, the initial rolling and the firm adhesion of leukocytes to the venular endothelium. A higher dose of 300µg ALP in comparison with the standard dose of 100µg did not increase the anti-adhesive action. Regarding microhaemodynamics pretreatment with ALP, especially after 300µg, reduces the venular red blood cell velocity und functional capillary density.

Our investigations clearly demonstrate an increased inflammatory cell reaction to the synovial vessel lining during the phase of initiation in absence of clinical signs in two established models for RA. Furthermore we could show in an antibody-induced model of arthritis, that application of ALP markedly suppresses the enhanced leukocyte-endothelial cell interaction.

Our data suggest that the development of new therapeutic interventions for RA may focus on the onset of disease and not on the chronic phase. Early inhibition of inflammatory microcirculatory dysfunction results in a decreased cellular joint infiltration of leukocytes and thus may inhibit pannus formation. ALP might represent a useful option for blocking leukocyte extravasation in therapy of joint inflammation, because its low molecular weight (11kd) and its cationic nature predispose for specific accumulation in cartilage and exerts additional antiprotease activities.

3. Einleitung

3.1. Rheumatoide Arthritis

Prävalenz und Klinik. Bei der rheumatoiden Arthritis (RA, chronische Polyarthritits) handelt es sich um eine chronische, inflammatorische Multisystemerkrankung mit dem charakteristischen Befund einer persistierenden Synovialitis, die fortschreitend alle Gelenke des menschlichen Organismus befallen kann. Die synoviale Entzündung im Rahmen der RA führt über eine granulierende, proliferierende Synovialitis (Pannus) zur Knorpeldestruktion und Knochenerosion mit konsekutiven Gelenkdeformationen (Sewell & Trendham 1993, Abb. 1).

Mit einer weltweiten Prävalenz von 1-2% stellt die RA die häufigste entzündlich rheumatische Erkrankung dar. Bei einem typischen Beginn der Erkrankung zwischen dem 35. und 45. Lebensjahr sind Frauen ca. 3 mal häufiger betroffen als Männer (Lipsky 1999). Für Patienten stehen die schmerzhaften Veränderungen der Gelenke mit klassischer Morgensteifigkeit im Vordergrund. Bevorzugt werden symmetrisch die Finger-, Zehen-, Hand- und Fußgelenke befallen. Die Gelenkveränderungen werden von unspezifischen, allgemeinen Symptomen wie Abgeschlagenheit, Gewichtsverlust und subfebrilen Temperaturen flankiert. Die Ausprägung der RA gestaltet sich sehr variabel und verläuft meist in Schüben. Dabei können nur wenige Gelenke mit einer minimalen Destruktion beteiligt sein bis hin zu einer rasch progressiven Polyarthritits mit kompletter Zerstörung der betroffenen Gelenke. Nach 10-12 Jahren weisen mehr als 80% der Patienten eine Einschränkung der Gelenkfunktion oder teilweise auch komplette Gelenkdestruktionen auf. In über 70% zeigen sich bei Patienten mit aktiver, progressiver RA bereits 2 Jahre nach Diagnosestellung radiologische Gelenkschäden (van der Heijde et al. 1992; Plant et al. 1994; Scott 2000).

Die Diagnosestellung ist mitunter schwierig, da insbesondere im Frühstadium mit dem Leitsymptom der schmerzhaften Gelenkschwellung leicht Verwechslungen mit anderen Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises (Morbus Bechterew, Sjögren Syndrom, Polymyositis, systemische Sklerose) auftreten können. Daher entwickelte das American College of Rheumatology (ACR) 1987 ein Kriterienkatalog, der heute weltweit zur Klassifikation der RA dient (Arnett et al. 1988). Wenn der Patient mindestens 4 der 7 folgenden ACR-Kriterien (Kriterien 1-4 für mind. 6 Wochen) erfüllt, gilt die Diagnose der RA als wahrscheinlich:

- 1) Morgensteifigkeit der Gelenke von mind. 1 Stunde Dauer
- 2) Entzündung, Schwellungen oder Flüssigkeitsansammlungen an mind. 3 Gelenken
- 3) Entzündung, Schmerzen oder Schwellung an mind. einem Hand- oder Fingergelenk
- 4) Symmetrische Arthritis
- 5) Subkutane Rheumaknoten
- 6) Nachweis von Rheumafaktoren im Serum
- 7) Typische Röntgenveränderungen der Hand- und Fingergelenke (z.B. gelenknahe Osteoporose, Erosionen).

Unterstützend werden vor allem im Verlauf und zur Beurteilung der Krankheitsaktivität unspezifische serologische Parameter, wie das C-reaktive Protein (CRP) und die Blutsenkgeschwindigkeit (BSG), herangezogen.

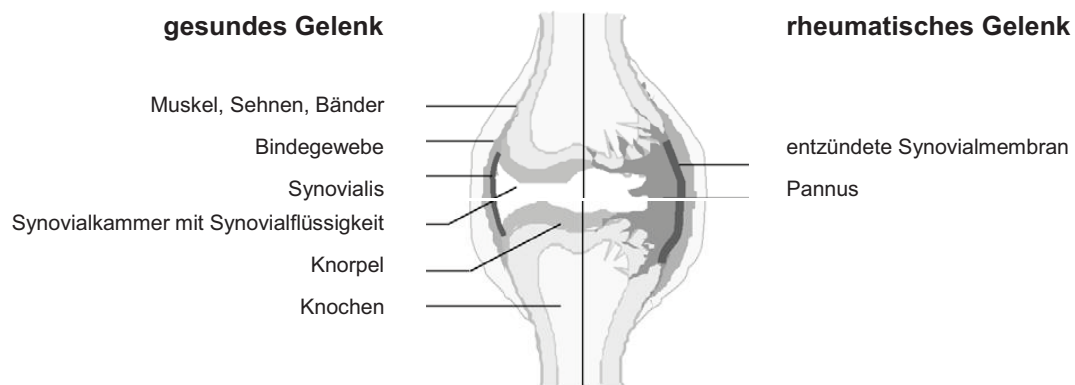


Abbildung 1: Morphologische Gelenkveränderungen bei der RA. Querschnitt durch ein Gelenk einer gesunden Person (links) und eines RA-Patienten (rechts); rheuma-online.de

Ätiologie und Pathogenese. Die Ätiologie der RA ist bereits vielfach diskutiert und untersucht worden. Man geht von einem komplexen multifaktoriellen Geschehen in einem genetisch prädisponierten Organismus aus. (Burkhardt und Möller 2003). So haben Zwillingsstudien gezeigt, dass der Einfluß von genetischen Faktoren wahrscheinlich ist. Die vorrangig zur Krankheitsdisposition beitragende erbliche Komponente liegt im HLA-DR-Locus. Patienten mit RA exprimieren präferentiell HLA-DR4 Allele (Cornelis et al. 1998; Griffiths et al. 1999; Fugger & Svejgaard 2000). Weiterhin besteht eine Assoziation mit spezifischen Major Histokompatibility Komplex (MHC) Klasse II Molekülen, die bei der Antigenpräsentation gegenüber den T-Lymphozyten beteiligt sind (Gregerson 1987). Zusätzlich wurde der Einfluß von Nicht-MHC-Genen auf die RA postuliert (Becker 1998).

Kritisch diskutiert wird die Hypothese einer Infektionsätiologie der RA. Viren, Bakterien sowie bakterielle Superantigene stehen unter Verdacht, als auslösende exogene Antigene die

RA zu triggern (Sieper et al. 2001). Möglich ist eine immunologische Kreuzreaktivität zwischen viralen bzw. bakteriellen Antigen determinanten und autologen Strukturkomponenten des Gelenkes, die eine von B- und T-Lymphozyten getragene, arthritogene Autoimmunität implizieren (Sakkas 1994). Ein alternatives Erklärungsmodell basiert auf dem durch persistierende Gelenkinfektionen mikrobiell veränderten Zytokinmilieu als Trigger v.a. der adaptiven Immunantwort. Definierte kausale Erreger, wie bei der Lyme-Arthritis oder reaktiven Arthritiden, konnten jedoch noch nicht belegt werden (Choy und Panayi 2001; Burkhardt und Möller 2003).

Neben exogenen Antigenen wurde in der Pathogenese der RA auch die Bedeutung der immunologischen Erkennung autologer Determinanten vielfach diskutiert. Dabei scheint die gestörte Autoimmunität vor allem während der Perpetuationsphase der RA eine Rolle zu spielen. Ein relevantes Autoantigen ist das knorpelspezifische Kollagen Typ II (CII). Die zunächst im Tiermodell demonstrierte präferentielle Erkennung physiologischer Sequenzen des Kollagenmoleküls durch autoreaktive T-Zellen, gefolgt von einer B-Zellaktivierung mit Antikörperbildung, konnte kürzlich auch für humane T-Zellen in Patienten mit RA gezeigt werden (Tarkowski et al. 1989; Terato et al. 1990; Cook et al. 1996; Cremer et al. 1998; Bäcklund et al. 2002; Burkhardt et al. 2002).

Die Integration vieler pathognomischer Aspekte ergibt das komplexe Bild einer Erkrankung, deren Phänotyp einer polygenen Beeinflussung unterliegt und im zeitlichen Verlauf großen Variationen unterworfen ist. Initial wird wahrscheinlich durch einen exogenen Faktor, evtl. ein infektiöses Agens, ein Autoimmunprozeß angestoßen, der in seiner T-Zell-Antwort in Richtung eines Th1-Phänotyps polarisiert ist und sich primär gegen gelenkspezifische Antigene wendet. Die Th1-assoziierte Immunantwort wird durch eine zelluläre Aktivierung v.a. von Makrophagen und dendritischen Zellen geprägt und durch die Zytokine IL-1 und TNF- α dominiert (Firestein 2003). Die initiierte Entzündungskaskade führt über eine gesteigerte Expression zellulärer Adhäsionsmoleküle zu einer Störung der synovialen Mikrozirkulation mit gesteigerter Leukozytenrekrutierung. Die emigrierten Leukozyten fördern und unterhalten durch Ausschüttung lysosomaler Enzyme, wie Proteasen, Hydrolasen und Kollagenasen den lokalen Entzündungsprozeß und tragen damit zur irreversiblen Degradierung des Knorpels bei (Feldmann et al. 1996). Weiterhin bewirkt die persistierende Freisetzung proinflammatorischer Zytokine im Gelenk eine Stabilisierung des chronischen Entzündungsprozesses in Richtung der gewebstestuierenden Endstrecke, die nunmehr gering parakrinen Regulationsmechanismen unterliegt.

Therapie. Eine kurative Behandlungsmöglichkeit der RA ist bis heute nicht bekannt. Mit dem Ziel, die Schmerzen zu lindern und das Fortschreiten der entzündlichen Gelenkdestruktion hinauszuzögern, sollte möglichst frühzeitig eine multimodale Therapie eingeleitet werden. Stützpfiler der lebenslangen Behandlung bildet die pharmakologische Stufentherapie begleitet von physikalischen Maßnahmen, die den funktionellen Erhalt erkrankter Gelenke unterstützen sollen. Bei Therapieresistenz stehen operative Eingriffe z.B. Synovektomie und prothetischer Gelenkersatz, Strahlentherapie sowie alternative Heilmethoden zur Verfügung (O'Dell 2004).

In Abhängigkeit von dem Erkrankungsstadium, der aktuellen Beschwerdesymptomatik des Patienten und der individuellen Nebenwirkungen kommen verschiedene Pharmaka zum Einsatz. Die Basis bilden Immunsuppressiva, die sog. disease modifying antirheumatic drugs (DMARDs), wie D-Penicillamin, Methotrexat und Cyclosporin. Die nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR), wie z.B. Acetylsalicylsäure, Ibuprofen, Indomethacin einschließlich der selektiven Cyclooxygenase-2-Inhibitoren sind, ebenso wie die Kortikosteroide, Phasen gesteigerter entzündlicher Aktivität vorbehalten (Willburger et al. 2006). Diese Substanzen wirken antiphlogistisch, analgetisch und antipyretisch. Weitere Verwendung finden die sog. Biologica, die rekombinanten Varianten natürlich vorkommender inhibitorischer Proteine (Drosos 2002). Dazu zählen die Anti-TNF- α -Therapeutika, wie Eterncept, Infliximab oder Adalimumab. Hohe TNF- α Konzentrationen im Synovialgewebe, sezerniert durch aktivierte Entzündungszellen, korrelieren mit lokalen, chondralen und ossären Erosionen und sind Ansatzpunkt der Anti-TNF- α Therapie (Willburger et al. 2006). Ebenfalls in die Gruppe der Biologica fallen die Anti-IL-1 β -Therapeutika (z.B. Anakinra). Diese neuen Medikamente verhindern durch Rezeptorblockade die IL-1 abhängige Aktivierung entsprechender Zielzellen (Brenishan et al. 1998).

Trotz intensiver Behandlung ist ein Voranschreiten der Erkrankung oft nicht aufzuhalten und bedingt häufig eine frühzeitige Invalidität des Patienten. Zusätzlich erzeugt die medikamentöse Therapie ein hohes Aufkommen an teilweise schweren Nebenwirkungen, wie z.B. gastrointestinale Ulzera und deren Blutungskomplikationen, Nieren- und Leberschädigungen, Panzytopenien bei Knochenmarksdepressionen sowie eine Abwehrschwäche mit zum Teil schweren viralen Infektionen.

Neben den hohen Behandlungskosten und sozioökonomischen Folgen der Erkrankung durch Schmerz, Invalidität und Berufsunfähigkeit erfordern v.a. die individuellen Einschränkungen der Lebensqualität sowie eine reduzierte Lebenserwartung des Betroffenen eine intensive Erforschung der RA und die Entwicklung neuer Therapieansätze.

3.2. Synoviale Mikrozirkulation

Das normale Synovium ist eine relativ azelluläre Struktur, bestehend aus einer Schicht Synoviozyten (Synovialmembran) und einer extrazellulären Matrix, wo Blutgefäße, Fettzellen, Fibroblasten und selten mononukleäre Zellen zu finden sind (Henderson & Edwards 1987). Die Bedeutung der Synovialis liegt in der Sezernierung der Synovialflüssigkeit, wodurch neben der Funktion als Gleitmittel insbesondere die nutritive Versorgung des gefäßlosen Gelenkknorpels sichergestellt wird. Die etwa 60µm dünne Synovialschicht des humanen Kniegelenkes mit einem Volumen von ca. 1,6cm³ versorgt ein ca. 20fach höheres Knorpelvolumen (Stevens et al. 1991). Um den Flüssigkeitsaustausch und die damit verbundene Nährstoffversorgung des Gelenkknorpels zu gewährleisten, besteht ein hoher synovialer Blutfluß und die kapillare Dichte der Kniegelenksschleimhaut ist im Vergleich zum Muskelgewebe ca. 3fach erhöht. Die nahe Lokalisation der Kapillaren zur Gelenkhöhle und die ebenfalls auf die Gelenkhöhle gerichtete Fenestration sind weitere wichtige architektonisch adaptive Eigenschaften des kapillaren Netzwerkes zur Sicherstellung der nutritiven Funktion (Levick & Smaje 1987).

Die entzündete Synovialmembran verdickt sich um ein vielfaches und ist durch eine hohe Zellinfiltration, von Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und Lymphozyten gekennzeichnet. Die Synovitis wird durch die mikrovaskuläre Akkumulation von Leukozyten und deren Adhärenz am mikrovaskulären Endothel initiiert. Daran schließt sich eine gezielte Emigration der Leukozyten ins perivaskuläre Gewebe mit Triggerung lokaler leukozytärer Entzündungsreaktionen an. Von dieser granulierenden, proliferierenden Synovialis (Pannus) wird der Knorpel schließlich überwuchert und zersetzt (Cunnane et al. 1998).

Die Wanderung der Leukozyten durch das Gefäßendothel, auch als Diapedese bezeichnet, ist ein komplexer, mehrstufiger Vorgang. Dabei unterscheidet man die Aktivierung, das „Rolling“, die Adhäsion und die Auswanderung der Leukozyten. Entscheidend beeinflusst wird die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion von Adhäsionsmolekülen (Yadav et al. 2003). Hierzu zählen die Selektine, Integrine und die Immunglobulin-Superfamilie. Der Gefäßaustritt wird durch Selektine eingeleitet, die infolge einer Stimulation, wie z.B. durch Zytokine oder LPS vermehrt exprimiert werden. Leukozyten präsentieren L-Selektine und Endothelzellen die E-Selektine. P-Selektine werden an der Oberfläche von Thrombozyten und in geringem Maße auf Endothelzellen präsentiert (Vestweber & Blanks 1999; Mannson et al. 2000). Die Wechselwirkung der Selektine mit korrespondierenden Glykoproteinen auf den Partnerzellen führt zu einer transienten Interaktion zwischen Leukozyten oder Thrombozyten mit der

Gefäßwand, dem sog. „Rolling“. Resultat der Selektin-vermittelten losen Interaktionen ist eine verminderte Fließgeschwindigkeit der Leukozyten im Blutstrom (Lawrence & Springer 1991). Die feste Anheftung der Leukozyten an das Gefäßendothel wird durch Integrine vermittelt. Integrine sind eine Familie heterogener Glykoproteine und setzen sich aus je einer α - und β -Kette zusammen. Anhand der β -Kette erfolgt die Einteilung der Integrine (Albelda & Buck 1990). Die $\beta 2$ -Subfamilie wird nur auf Leukozyten exprimiert. Vor allem die $\beta 2$ -Integrine LFA und MAC-1 sind von besonderer Bedeutung für entzündliche Prozesse (Hynes 2002). Nach Stimulation z.B. durch Chemokine oder proinflammatorische Zytokine (TNF- α , Il-1 β) werden die in zytoplasmatischen Granula gespeicherten Moleküle rasch auf der Leukozytenoberfläche exprimiert (Lentsch & Ward 2000). Aktivierte Integrine weisen eine erhöhte Affinität gegenüber ihren Liganden auf der Oberfläche von Endothelzellen auf (Ginsberg et al. 1992; Liberek et al. 2004). Zu den endothelialen Liganden der leukozytären Integrine zählen ICAM, VCAM und PECAM. Diese interagierenden endothelialen Adhäsionsmoleküle gehören der Immunglobulin-Superfamilie an. Die feste Bindung der Leukozyten an das Gefäßendothel beendet das Rolling und ermöglicht den Leukozyten, am nächsten Interzellularspalt zwischen den Endothelzellen hindurch zu treten. Damit die Durchquerung des Endothels erfolgen kann, muss die Integrin-vermittelte Adhäsion der Leukozyten an endotheliale Adhäsionsmoleküle wieder gelöst werden. Die genauen molekularen Abläufe dieses Schrittes sind noch unklar (Muller et al. 1993; Norman & Hickey 2005; Barreiro et al. 2007; Vestweber 2007; Abb. 2). Die anschließende gezielte Wanderung der Leukozyten durch das Gewebe verläuft zum einen entlang eines Konzentrationsgradienten aus Chemokinen, die von aktivierten Zellen am Entzündungsherd sezerniert werden, aber auch getriggert durch chemotaktische Faktoren, wie aktivierte Komplementfaktoren (C5a), PAF oder Eicosanoide (Taub 1996).

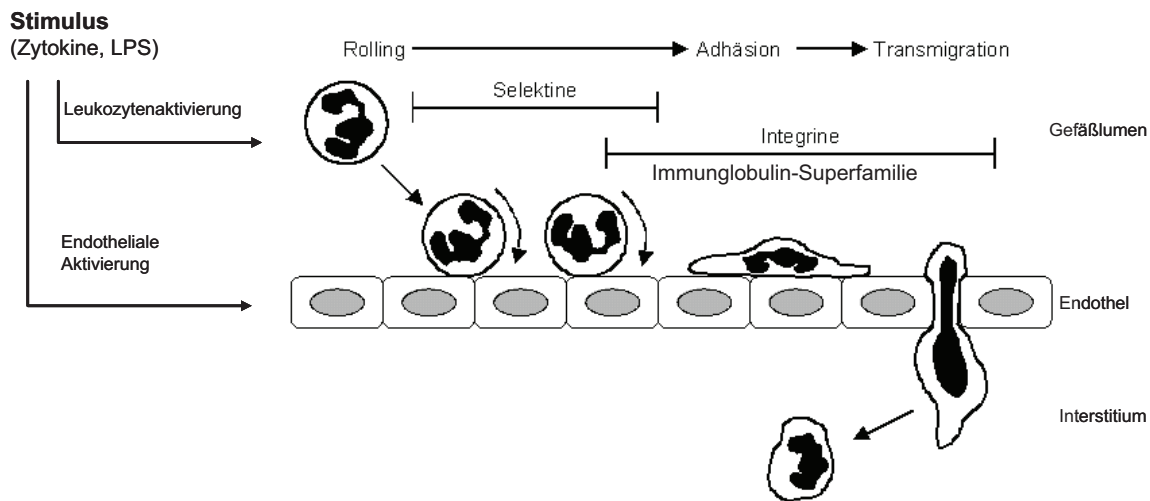


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Leukozytendiapedese.

Proinflammatorische Zytokine vermitteln Zell-Zell-Kontakte durch Anregung der Expression von Adhäsionsmolekülen und nehmen dadurch eine zentrale Rolle bei der Leukozytendiapedese ein (Springer 1990; Shong et al. 1994; Ward et al. 1994). Zytokine werden von aktivierten Zellen, wie Monozyten, Makrophagen, neutrophile Granulozyten und Endothelzellen, in das umgebende Medium abgegeben oder bleiben als Membranproteine in der Zellwand verankert. Sie können eine Vielzahl von Zelltypen beeinflussen (Pleotropismus). Zytokine binden mit hoher Affinität an spezifische Rezeptoren der Zielzellen und induzieren dadurch eine gesteigerte Transkription von Genen, welche die Zielzelle mit besonderen Fähigkeiten und Funktionen ausstattet (Abbas et al. 1997; Rieber 1995). Im Besonderen wurde die Aktivierung des nukleären Transkriptionsfaktors NF κ B durch viele Studien fokussiert. Es ist bekannt, dass NF κ B zahlreiche Gene wie Zytokine, Chemokine, zelluläre Liganden sowie Adhäsionsmoleküle reguliert und somit entscheidenden Einfluß auf die Leukozytenrekrutierung und die Pathogenese der RA nimmt (Fujisawa et al. 1996). Die wichtigsten proinflammatorischen, d.h. entzündungsfördernden Zytokine sind TNF- α , IL-1 und IL-6. Vor allem TNF- α und IL-1 fördern durch Induktion einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen die Adhärenz zwischen Granulozyten und Endothelzellen (Gamble et al. 1985).

3.3. Tiermodelle

In der Erforschung von Autoimmunerkrankungen spielen Tiermodelle seit Jahrzehnten eine bedeutende Rolle. Tiermodelle zeigen klinische und histologische Analogien zu menschlichen Autoimmunerkrankungen. Sie werden insbesondere für das Studium von genetischen, immunologischen und umweltbedingten Faktoren eingesetzt.

Bis heute wurden zahlreiche Tiermodelle zur RA in Kaninchen (Dumonde & Glynn 1962), Ratten (Cathcart et al. 1986), Affen (Yoo et al. 1988) und Mäusen (Courtenay et al. 1980) entwickelt und etabliert. Eines der ersten Tiermodelle zur RA, welches auch heute noch vielfach genutzt wird, ist die Adjuvant-induzierte Arthritis. Stoerk und Mitarbeiter (1954) sowie Pearson und Wood (1959) beobachteten erstmalig nach Adjuvanzinjektion eine Polyarthritits in Ratten (Stoerk et al. 1954; Pearson & Wood 1959). Ein weiteres, ebenfalls heute noch vielfach angewandtes Modell ist die Antigen-induzierte Arthritis (AIA). Dabei wird die Arthritis durch eine intraartikuläre Antigenapplikation ausgelöst. Während Dumond und Glynn 1962 eine chronische Synovitis in sensibilisierten Kaninchen durch intraartikuläre Fibrininjektionen induzierten (Dumonde & Glynn 1962), werden heute bovines Serumalbumin und Ovalbumin, aber auch adjuvantes CII und Bakterienpeptidoglykane zur Arthritisinduktion verwendet (Cooke & Jasin 1972; Brackertz et al. 1977). Neben den bereits genannten Modellen existieren weitere anerkannte Arthritismodelle, wie z.B. die Streptokokken-Zellwand-induzierte Arthritis (Wilder, 1988) oder die Proteoglykan-induzierte Arthritis, welche sich hinsichtlich ihrer jeweils zu Grunde liegenden Pathophysiologie unterscheiden (Glant et al. 1987, 2003). Vordergründig werden Ratten- und Mausmodelle verwendet. Für spezifische Fragestellungen stehen im Besonderen genetisch modifizierte Mausstämme zur Verfügung (Hang et al. 1982; Tanaka et al. 1988).

Das heute meist eingesetzte und bekannteste Mausmodell zur RA ist die *Kollagen-induzierte Arthritis (CIA)*, welche erstmalig im Jahr 1977 durch Trentham und Mitarbeiter beschrieben wurde. Dabei wurden zunächst Ratten (Trentham et al. 1977; Hart et al. 1993) und später Mäuse (Wooley et al. 1981) und Primaten (Jansson et al. 1998; Hart et al. 1993) mit homologen oder heterologen CII gelöst in Komplettes Freund'sches Adjuvans immunisiert. Die Immunantwort gegen CII, dem Hauptbestandteil des Gelenkknorpels (Cremer et al. 1998; Trentham et al. 1977), erzeugt eine Polyarthritits mit allen Facetten der RA (Wooley et al. 1981; Holmdahl 1991). Das Modell der CIA der Maus zeichnet sich durch eine umfangreiche Charakterisierung der Pathogenese sowie der zugrunde liegenden immunologischen Basis aus.

Die Empfänglichkeit und Ausprägung der CIA ist, konkordant zur humanen RA, eng verknüpft mit den MHC Genen (Wooley et al. 1981, 1985). Nur Mausstämme mit MHC-2^q und MHC-2^r gelten als sensitiv (Brunsberg et al. 1994; Svensson et al. 1998). Die MHC-Klasse II Moleküle binden die gleiche CII Peptidregion wie das HLA-DR4 Allel, welches mit der RA assoziiert wird (Anderson et al 1998). Die genetische Assoziation der CIA mit den MHC-II Haplotypen H2-A^q und H2-A^r zeigt die Wichtigkeit von T-Zellen bei der Entstehung der Autoimmunerkrankung. Dies ist durch Untersuchungen gestützt, welche belegen, dass Mäuse ohne $\alpha\beta$ -T-Zellen komplett resistent gegenüber der CIA sind (Corthay et al. 1999). Weiterhin führte eine Behandlung mit monoklonalen Antikörpern gegen T-Zell Rezeptoren (TCR) zu einer signifikant reduzierten Inzidenz der CIA, was die Bedeutung der TCR-Expression (V β 11.1; V β 8.2) hervorhebt (Moder et al. 1992; Maeda et al. 1994). Weitere CIA assoziierte Gene sind Basigin, FAP, Cathepsin K, CD53, RAF1 und Glukagon (Ibrahim et al. 2002).

Die CII-Exposition erzeugt eine Polyarthrititis, die sowohl dem klinischen als auch dem histologischen Bild der RA ähnelt (Trentham et al. 1982; Courtenay 1980). Das klinische Bild wird durch Rötungen, Schwellungen und Ödeme der Gelenke geprägt, gefolgt von Funktionseinschränkungen, Ankylosen und Deformationen. Histologische Charakteristika der CIA sind Synovialmembranproliferation, Gefäßveränderungen, inflammatorische Zellinfiltration und Pannusbildung mit Knorpel- und Knochenzerstörung (Trentham et al. 1977). Obwohl über den Pathomechanismus der CIA noch immer wenig bekannt ist, haben verschiedene Studien belegt, dass Assoziationen mit einer Reihe von sowohl humoralen als auch zellulären Immunantworten bestehen (Hom et al. 1986; Seki et al. 1988; Holmdahl et al. 1990). Die Immunisierung mit CII bewirkt eine T- und B-Zell-Aktivierung gefolgt von einer Lymphozytenmigration ins Gelenk. Die Emigration der aktivierten Lymphozyten ins Gewebe setzt eine Entzündungskaskade in Gang, welche die Aktivierung von Makrophagen, Monozyten, ortsständiger Synoviozyten und Fibroblasten beinhaltet (Holmdahl et al. 1991). Die Bildung von Zytokinen und anderen Mediatoren zusammen mit der fortschreitenden Zellinfiltration tragen entscheidend zur Initiation und Fortschreiten der CIA bei (Feldmann et al. 1996).

Bei der *Anti-Kollagen Antikörper-induzierten Arthritis (CAIA)* wird durch den Transfer von CII-spezifischen monoklonalen Antikörpern eine akute Form der Arthritis in gesunden Mäusen induziert. Die CAIA ist ein neues und derzeit intensiv genutztes Tiermodell für Studien zur inflammatorischen Phase der Arthritis.

Die Bedeutung von Antikörpern bei der Pathogenese einer autoimmunen Arthritis wurde sowohl in Tiermodellen als auch bei Patienten mit RA vielfach belegt (Andriopoulos et al. 1976; Beard et al. 1980; Cook et al. 1996). Antikörper gegen CII können im Serum und in Gelenken bei 30-70% der Patienten mit RA in Abhängigkeit vom Stadium der Erkrankung nachgewiesen werden (Cook et al. 1996). Antikörper gegen CII, welche aus dem Plasma von Patienten mit RA gereinigt wurden, induzierten nach i.v. Injektion in gesunden Mäusen eine Arthritis (Wooley et al. 1984). Ebenfalls gut dokumentiert ist die Relevanz von CII-spezifischen Antikörpern während der Progression der CIA (Wooley et al. 1981; Seki et al. 1988). Weitere Studien zeigten, dass hoch empfängliche Mäuse für CIA mit einer B-Zell-Defizienz gegenüber einer Arthritisentwicklung resistent sind (Svensson et al. 1998). Der passive Transfer von Serum, Immunglobulinfraktionen und purifizierten CII-Antikörpern wirkt direkt pathognomisch und induziert eine erosive Arthritis in gesunden Primaten (Stuart et al. 1982; Stuart & Dixon 1983; Loutis et al. 1988).

Erste Untersuchungen mit einzelnen monoklonalen Antikörpern erzeugten in DBA/1 Mäusen nur geringe Veränderungen der Synovialis aber keine makroskopisch sichtbare Arthritis (Holmdahl et al. 1986). Weitere Studien zeigten eine erhöhte Effizienz der Arthritisinduktion durch den Einsatz von Kombinationen aus verschiedenen Anti-CII monoklonalen Antikörpern. Vor allem in Verbindung mit Lipopolysaccharid (LPS) erzeugten verschiedene Arbeitsgruppen durch Antikörperexposition schwere Arthritiden (Johansson et al. 2001; Itoh et al. 2002; Kato et al. 2003; Murata et al. 2003; Sehnert et al. 2004, 2006). Dabei kann LPS als zweiter Immunstimulus genutzt werden, ist aber nicht essentiell für die Induktion der CAIA (Nandakumar et al. 2003b). Am effektivsten hat sich die Kombination aus zwei spezifischen monoklonalen Antikörpern, CIICI und M2.139, bei der Arthritisinduktion in Mäusen erwiesen. Der aus CII immunisierten DBA/1 Mäusen isolierte CIICI Klon produziert IgG2a Antikörper mit spezifischer Bindung an das C1 Epitop (Holmdahl et al. 1986). Das C1 Epitop bildet das Hauptepitop bei der Antikörperimmunantwort gegen CII, wobei verschiedene Antikörper unterschiedliche Anteile des Epitops erkennen (Schulte et al. 1998). Der M2.139 Klon wurde ebenfalls aus DBA/1 Mäusen gewonnen und produziert IgG2b Antikörper, die eine Bindung mit dem J1 Epitop des Kollagenmoleküls eingehen (Mo & Holmdahl 1996). Beide Antikörper inhibieren in vitro die Kollagenverknüpfung (Gray et al. 2004) und bewirken eine Disorganisation von CII-Fibrillen in der extrazellulären Matrix (Amirahmadi et al. 2005).

Im Gegensatz zur RA und der CIA ist die Empfänglichkeit für die CAIA unabhängig von MHC Allelen (Nandakumar et al. 2004). Es sind Assoziationen mit Nicht-MHC Genen

bekannt. Beispielsweise wurde in B10.Q Mäusen nachgewiesen, dass das Segment RIII S/J der Chromosomen 10 und 19 die Entwicklung der CAIA signifikant fördert (Nandakumar & Holmdahl 2005).

Die CAIA verläuft weitestgehend unabhängig von T- und B-Zellen, wobei ein modulatorischer Effekt insbesondere von T-Zellen nicht ausgeschlossen wird (Nandakumar et al. 2004; Mitamura et al. 2007). Neutrophile Granulozyten und Makrophagen stellen die Hauptmediatoren der Inflammation dar (Nandakumar 2003b). Diese werden durch Interaktionen zwischen den Fc-Fragmenten von CII-gebundenen Antikörpern und den zellständigen Fc γ -Rezeptoren aktiviert (Nandakumar et al. 2003a). Weiterhin spielen Zellaktivierungen, welche durch das Komplementsystem vermittelt werden, eine wichtige Rolle (Hietala et al. 2004; Nandakumar & Holmdahl 2006).

Nach dem systemischen Antikörpertransfer entwickeln die Mäuse in nur wenigen Tagen eine klinisch symptomatische Arthritis mit Rötung und Schwellung der Gelenke (Nandakumar 2003b). Das histologische Bild der CAIA korreliert mit dem klinischen Bild und ist durch Synovitis, intraartikuläre Zellinfiltrationen, Pannusformation sowie Knorpel- und Knochenerosionen charakterisiert. Kennzeichnend für die CAIA ist eine massive Gelenkinfiltration durch neutrophile Granulozyten und wenige Makrophagen (Nandakumar 2003b).

Beide Modelle sind etabliert und konnten durch ihren vielfältigen Einsatz erfolgreich zur Entschlüsselung und dem besseren Verständnis der RA beitragen. Außerdem werden sie erfolgreich zur Erprobung sowie zum Screening neuer Therapeutika genutzt.

3.4. Antileukoproteinase

Die Antileukoproteinase (ALP) ist ein hoch basisches, säurestabiles Polypeptid, welches die Fähigkeit besitzt zahlreiche inflammatorische Prozesse, insbesondere als Inhibitor der neutrophilen Serinproteinasen, physiologisch zu hemmen (Grütter et al. 1988).

Extrazelluläre Serinproteinasen werden während der Inflammation durch aktivierte neutrophile Granulozyten sezerniert und sind verantwortlich für proteolytische Gewebeschädigungen. Wichtige Vertreter sind die Elastase und Kathepsin G. Serinproteinasen sind in verschiedene Erkrankungen, wie z.B. das Lungenemphysem und die degenerative RA, involviert (Boudier et al. 1984; Wotorek et al. 1988).

Ursprünglich wurde ALP als spezifischer Protektor von proteolytischen Attacken im oberen Respirationssystem beschrieben (Boudier et al. 1988; Kramps et al. 1991). Weiterhin konnte das Polypeptid im Urogenitaltrakt (Heinzel et al. 1986) sowie in Speichel- und Hormondrüsen (Thompson & Ohlsson 1986) nachgewiesen werden. Neben der Präsenz in epithelialen Geweben wurde die physiologische Expression von ALP auch in zahlreichen extramukösen Zellen demonstriert, insbesondere in neutrophilen Granulozyten (Böhm et al. 1992) und Makrophagen (Yin et al. 1997).

ALP zirkuliert im Blut, ist aber durch das niedrige Molekulargewicht (11kd) und dem kationischen Charakter ($\text{pH} > 10$) prädisponiert, die Zirkulation zu verlassen und in spezifischen Geweben zu akkumulieren (Böhm et al. 1991).

Ein wesentliches Charakteristikum degenerativer, inflammatorischer Gelenkerkrankungen ist die Knorpeldestruktion. Die hohe Präsenz und die spezifische Akkumulation von ALP im Gelenkknorpel nehmen protektiven Einfluß auf die proteolytische Degeneration der bradytrophen Knorpelmatrix (Bohm et al. 1991; Burkhardt et al. 1997). Das inhibitorische Spektrum von ALP am Gelenkknorpel beinhaltet die Leukozytenelastase und Kathepsin G. Diese Enzyme üben direkte proteolytische Aktivitäten gegenüber Proteoglykanen und Kollagen aus und sind verantwortlich für die Aktivierung latenter Matrixmetalloproteinasen (Okada & Nakanishi 1989). Metallo- und Serinproteinasen (Clark et al. 1993; Barrett 1978) sind mitverantwortlich für die Initiation des Matrixabbaus am Gelenkknorpel.

Neben den anti-proteolytischen Fähigkeiten nimmt ALP auf eine Vielzahl anti-inflammatorischer Prozesse in Monozyten und Neutrophilen positiven Einfluss (Zhang et al. 1997; Sehnert et al. 2004, 2006). Bisherige Studien zeigten, dass ALP die LPS-induzierte Produktion von Prostaglandin E_2 und Matrixmetalloproteinasen supprimiert und die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte Peroxidsynthese hemmt (Zhang et al. 1997). Man vermutet, dass die Inhibition der

Lipopolysaccharidantwort in Makrophagen mit einem hemmenden Effekt von ALP auf die NF- κ B Aktivierung verknüpft ist (Taggart et al. 2002). Der Transkriptionsfaktor NF- κ B nimmt eine zentrale Rolle bei einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen einschließlich Entzündung, Immunantwort, Apoptose sowie Tumorentstehung und -wachstum ein. Dabei ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Zelltyp-spezifisch (Ahmed-Choudhury et al. 2003) und Stimulus-abhängig (Karin & Ben Neriah 2003).

Kürzlich wurde in der Maus demonstriert, dass die Behandlung mit ALP sowohl die Inzidenz als auch die Schwere der CAIA signifikant vermindert. Die klinischen Erfolge wurden durch histologische Ergebnisse untermauert. Diese zeigten nach ALP-Exposition eine verminderte Leukozyteninfiltration des Synovialgewebes und eine Reduktion von Knorpel- und Knochenerosionen. Die ALP-vermittelte Suppression der Gelenkinfiltration und -inflammation ist vermutlich Resultat der reduzierten Leukozytenaktivierung und damit verminderten Leukozytenemigration ins Gewebe. Der inhibitorische Effekt von ALP kann zumindest teilweise der Beeinflussung von Zytoskelettveränderungen in Fc-Rezeptor stimulierten neutrophilen Granulozyten zugeschrieben werden (Sehnert et al. 2004). ALP hemmt effizient die Aktivierung von β_2 -Integrinen auf Leukozyten sowie weitere Funktionen, die von Zytoskelettorganisation, einschließlich oxidativer Verbrennung und Phagozytose abhängig sind (Sehnert et al. 2004, 2006).

Trotz intensiver Studien sind die genauen Funktionen und das umfassende Spektrum der anti-inflammatorischen Fähigkeiten von ALP noch nicht hinreichend entschlüsselt und definiert. Neben der derzeitigen Hauptfunktion, der entzündlichen Gewebeprotektion, wurde u. a. eine Überexpression von ALP in zahlreichen Karzinomen (Garver et al. 1994) nachgewiesen. Des Weiteren wurden anti-virale (McNeely et al. 1995), anti-mykotische (Tomee et al. 1997) und anti-bakterielle Aktivitäten (Hiemstra et al. 1996) in Studien gezeigt. Neben der physiologischen Rolle von ALP als endogenes Inhibitormolekül und Regulator zahlreicher immunologischer Prozesse lassen die dargestellten Funktionen und bisherigen Untersuchungen ein therapeutisches Potential bei der Behandlung von destruktiven Gelenkerkrankungen, insbesondere bei der Therapie der RA, vermuten.

3.5. Zielsetzung

Inflammatorische Gelenkveränderungen, eingeleitet durch Leukozytendiapedese und gekennzeichnet durch zelluläre Infiltrationen, Aktivierung von Proteinasen und Knorpeldegeneration, stellen den Schlüsselpunkt der RA dar. Ein besseres detailliertes und mechanistisches Verständnis insbesondere zur Initiation, aber auch Progression und chronischen Entwicklung der RA ist die Voraussetzung für die Entwicklung neuer effizienter Therapieansätze. Die direkte online-Visualisierung mit der Technik der Intravitalmikroskopie ermöglicht in vivo Einblicke in das komplexe Szenario zellulärer Immunantworten einschließlich zellulärer Interaktionen mit der Endothelwand innerhalb der Mikrozirkulation. Die in vivo Mikroskopie wurde bereits erfolgreich im Kniegelenk der Maus am Modell der Antigen-induzierten Arthritis angewandt (Veihelmann et al. 1998). Obwohl die Antigen-induzierte Arthritis ebenso ein etabliertes und angesehenes Tiermodell für Untersuchungen zur humanen RA darstellt, haben wir mit der CIA und der CAIA zwei Modelle gewählt, die derzeit führend unter den verwendeten Tiermodellen der Maus sind. Dabei entschieden wir uns bewusst für zwei Arthritismodelle, die sich hinsichtlich der Kinetik unterscheiden. Während es sich bei der CIA um ein chronisches Modell handelt, stellt die CAIA ein akutes Modell zur RA dar.

Unser Ziel war es zum einen die Mikrozirkulation des Kniegelenkes in beiden Modellen mittels Fluoreszenzmikroskopie zu charakterisieren, um dann in einem zweiten Schritt den Effekt von ALP auf die Effektorphase der CAIA zu untersuchen. Die Visualisierung der synovialen Mikrozirkulation diente dem mikrohämodynamischen Monitoring und der Beurteilung von Leukozyten-Endothelzell-Interaktion. Das spezielle Interesse an den initialen Schritten der Erkrankung veranlasste uns, in allen Versuchen die Mikrozirkulation der Synovialis zu einem frühen Zeitpunkt, noch vor dem Auftreten klinischer Arthritis Symptome zu beurteilen. Die mikrozirkulatorischen Analysen erfolgten zum einen mit dem Ziel, weitere pathogenetische Informationen zur Initiationsphase der Arthritis zu gewinnen, und zum anderen die anti-inflammatorischen Eigenschaften von ALP während dieser Phase zu untersuchen. Unsere Erwartungen, Analysen und Ergebnisse zielen im weiteren Sinne auf die Entwicklung neuer effizienter Strategien zur Behandlung der RA ab.

4. Material und Methodik

4.1. Versuchsabschnitt I

Der Versuchsabschnitt I erfolgte unter dem Gesichtspunkt der mikrozirkulatorischen Charakterisierung der Synovialis mittels der in vivo Fluoreszenzmikroskopie im Kniegelenk der Maus nach Induktion eines rheumatoiden Krankheitsbildes. Dabei fokussierten wir auf die Initiationsphase in zwei etablierten Tiermodellen zur RA, die sich vordergründig durch ihre Kinetik unterscheiden. Verschiedene Mausstämme wurden nach Arthritisinduktion frühzeitig der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie des Kniegelenkes zugeführt, ergänzt durch die klinische Evaluation sowie histologische Aufarbeitungen der Kniegelenke.

4.1.1. Versuchstiere

Die gesamte tierexperimentelle Durchführung und Protokollierung wurden durch das Staatliche Veterinäramt genehmigt. Während der Studie wurden die Bedingungen und Anforderungen gemäß dem Tierschutzgesetz §8 (1) eingehalten.

Im Versuchsabschnitt I kamen verschiedene Mausstämme mit unterschiedlicher Suszeptibilität für die CIA und CAIA zum Einsatz. Die DBA1/J Maus (Wildtyp) ist ein ursprünglicher Mausstamm, der sowohl spontan als auch nach Immunisierung mit CII für die Entwicklung einer Arthritis empfänglich ist (Holmdahl 1990; Holmdahl 1992). Die Empfänglichkeit für die CIA basiert auf dem genetischen Hintergrund MHC Haplotyp 2q. Die DBA1/J Maus ist ebenfalls empfänglich gegenüber der CAIA, wobei die Suszeptibilität unabhängig vom MHC Haplotyp ist.

T-Zell-Rezeptor (TCR) transgene Mäuse wurden aus einer CII spezifischen T-Zell-Kreuzung isoliert und tragen die veränderten Genkettenabschnitte V β 11.1 und V β 8.2 (Osman 1998). Die daraus resultierende vermehrte Expression der T-Zell-Rezeptoren vom Typ V β 11.1 und V β 8.2 trägt entscheidend zur Arthritisempfindlichkeit bei.

Als Kontrolle dienten FVB/NJ Mäuse, welche ebenfalls den für die Arthritisempfindlichkeit charakteristischen MHC Haplotyp (H2q) Genhintergrund tragen. FVB/NJ Mäuse sind aber in Folge eines genetischen Verlustes des TCR V β Segments gegenüber einer Arthritisinduktion resistent (Osman 1999).

DBA/1J und FVB/NJ Mäuse wurden von Jackson Laboratories (Maine, USA) bezogen. Die TCR transgenen Mäuse wurden uns freundlicherweise von Prof. Ladiges, University of Washington (USA) zur Verfügung gestellt.

Die Tierhaltung erfolgte gemäß den Standardbedingungen in der Zentralen Versuchstierhaltung der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock am Institut für Experimentelle Chirurgie. Es wurden männliche Mäuse im Alter von 6 bis 8 Wochen und einem Gewicht zwischen 15-20g verwendet. Die Mäuse wurden in rostfreien Stahlkäfigen in einem klimatisierten Raum bei 12 Stunden Tag-/Nachtrhythmus unter Bereitstellung von Standardfutter für Nager und Wasser ad libitum untergebracht. Die Versorgung der Versuchstiere stellten ausgebildete Veterinärmediziner und Tierpfleger sicher.

4.1.2. Modelle

Für den ersten Abschnitt unserer Versuchsreihen nutzten wir die CIA, ein Tiermodell zur Erzeugung einer chronischen Gelenkentzündung, sowie das Modell der CAIA, welches sich durch eine akute Verlaufsform nach Immunisierung auszeichnet. In beiden Modellen weist die resultierende Arthritis im Verlauf alle Facetten des Krankheitsbildes der rheumatoiden Arthritis auf (Myers et al. 1997; Nandakumar 2003b).

Kollagen-induzierte Arthritis. Bei der CIA erzeugt die Immunantwort auf das applizierte CII in empfänglichen Mausstämmen eine chronisch inflammatorische Gelenkentzündung (Trentham 1977; Cathcart 1986). Die Immunisierung der Mäuse erfolgt durch eine Injektion von 125µg bovinem CII (Chondrex, Redmond, WA, USA) gelöst in CFA (DIFCO, Detroit, MI, USA). Die Emulsion wird intradermal im Bereich der Schwanzbasis appliziert. Circa 5-6 Wochen später entwickeln die Tiere erste klinische Zeichen einer Gelenkentzündung (Holmdahl et al. 1985; Burkhardt & Kalden 1997a). Im frühen Stadium der CIA dominieren Rötungen und Schwellungen der kleinen Gelenke, insbesondere der Vorderpfoten. Im Verlauf entwickeln sich starke Schwellungen mit daraus resultierenden Funktionseinschränkungen der Vorder- und Hinterpfoten (Holmdahl 1985b). Das histologische Bild weist einige Eigenschaften der Rheumatoidarthritis auf. Kennzeichen der Histologie sind mononukleäre Zellinfiltration, Synovialzellhyperplasie und Pannusbildung.

Anti-Kollagen Antikörper-induzierte Arthritis. Im Modell der CAIA wird durch den Transfer von spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen CII eine akute Polyarthritis induziert (Nandakumar 2003a). Das Kollagenmolekül trägt zahlreiche Anti-CII Epitope, die in repetitiver Struktur an der Knorpeloberfläche lokalisiert sind. Zur Induktion der CAIA nutzten wir zwei monoklonale IgG Anti-CII Antikörper (M2.139 und C2C1). Bei den verwendeten Antikörpern handelt es sich um zwei IgG Subklassen, die an zwei unterschiedliche Epitope des Kollagenmoleküls binden. Der Antikörper M2.139 vom Subtyp IgG2b bindet an das

Epitop J1 und der C2C1 Antikörper vom Subtyp IgG2a an das C1 Epitop des CII Moleküls (Nandakumar 2003b). Nach Entwicklung zahlreicher monoklonaler Antikörper zeigten Studien, dass die Kombination dieser beiden Antikörper (M2.139; C2C1) das stärkste Potential besitzt, eine schwere erosive Arthritis in gesunden Mäusen zu induzieren (Nandakumar 2003b). Die Immunisierung der Mäuse erfolgt durch die i.v. Applikation eines Antikörpercocktails. Das Gemisch setzt sich aus jeweils 4,5mg der beiden monoklonalen Antikörper (M2.139; C2C1) zusammen. Unter der Standarddosis entwickeln die Mäuse in nur wenigen Tagen eine deutliche, klinisch symptomatische Arthritis. Die charakteristische Arthritis mit Rötung und Schwellung der Gelenke erreicht Ihren Peak zwischen dem 7. und 10. Tag. Das histologische Bild der CAIA ist durch eine Synovitis mit massiver Infiltration durch neutrophile Granulozyten gekennzeichnet (Nandakumar 2003b).

Die Antikörper wurden uns freundlicherweise von Rickard Holmdahl (Göteborg Universität, Schweden) zur Verfügung gestellt. Die Aliquots, bestehend aus gleichen Mengen (Antikörperkonzentration: 4,5mg/375µl) der steril gefilterten Antikörperlösungen, wurden bis zu ihrem Verbrauch bei -80°C gelagert.

4.2. Versuchsabschnitt II

Im zweiten Abschnitt untersuchten wir die Wirksamkeit von ALP im Tiermodell der CAIA. Wie unter dem Abschnitt 4.1.2. beschrieben, wurde durch den Transfer von CII-spezifischen monoklonalen Antikörpern eine akute Arthritis in gesunden DBA1/J Mäusen induziert. Zur Beurteilung des Effektes von ALP während der Initiationsphase der CAIA erfolgte analog zum Versuchsabschnitt I die in vivo Fluoreszenzmikroskopie des Kniegelenkes, begleitet von klinischen Evaluationen der Gelenke und histologischen Aufarbeitungen der Kniegelenke.

4.2.1. Versuchstiere

Für die Untersuchungen nutzten wir männliche, 6-8 Wochen alte DBA1/J Mäuse (Wildtyp), ein Mausstamm mit bekannter Suszeptibilität für CAIA. Die Tiere wurden von Taconic Europe (Dänemark) bezogen. Die Tierhaltung erfolgte gemäß den Standardbedingungen, wie beschrieben im Versuchsabschnitt I in der Zentralen Versuchstierhaltung des Instituts für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock.

4.2.2. Modell

Das Modell der CAIA wurde bereits ausführlich unter dem Abschnitt 4.1.2. beschrieben.

4.2.3. Rekombinante Antileukoproteinase

Antileukoproteinase, auch secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) genannt, ist ein hoch basischer ($\text{pH} > 10$), säurestabiler Inhibitor der neutrophilen Serinproteinasen (Böhm et al. 1991). Das Protein weist eine hohe Präsenz in epithelialen Sekreten, insbesondere des oberen Respirations- und Urogenitaltraktes (Boudier et al. 1988; Kramps et al. 1991; Heinzel et al. 1986), aber auch in extramukösen Zellen, einschließlich neutrophilen Granulozyten (Böhm et al. 1992) und Makrophagen auf (Yin et al. 1997).

ALP gehört zur Gruppe der “Trappin“ Genfamilie (Seemüller 1986, Thompson 1986), einem Akronym für **TR**ansglutaminase Substrat und **wAP** Domänen enthaltende **ProteINe**. Diese Proteine können in Geweben akkumulieren und agieren. Proteine der “Trappin“ Familie besitzen zwei funktionelle Domänen, zum einen die N-terminale Transglutaminase Substrat Domäne und eine C-terminale inhibitorische Domäne (WAP) (Schalkwijk 1999). Die funktionellen Domänen von ALP setzen sich aus der COOH-terminalen Domäne, welche Proteinase hemmende Funktionen besitzt, und der NH₂-terminalen Domäne zusammen. Die Funktion der endständigen NH₂-Domäne ist weitestgehend unbekannt. ALP ist ein kationisches Polypeptid, welches durch ein niedriges Molekulargewicht (11kd) charakterisiert ist (Böhm et al. 1991).

ALP wurde als rekombinantes Protein in *Escherichia coli* produziert und in einem mehrstufigen Protokoll mittels Eisenaustauschern sowie Metallchelaten und Größenausschlußchromatographie gereinigt und homogenisiert, wie ursprünglich durch Heinzel-Wieland und Mitarbeiter beschrieben (Heinzel-Wieland et al. 1991). Die analytische Rücklaufphasenchromatographie zeigte eine Spitze, und die SDS-PAGE offenbarte eine einzelne Bande mit erwarteter elektrophoretischer Mobilität nach der Eisenmarkierung. Dieses Material wurde über die Hemmung der granulozytären Elastase und Kathepsin G getestet. Um sicher zu stellen, dass jegliche Endotoxinkontamination eliminiert wurde, erfolgte die Behandlung der ALP-Aufreinigungen mit Detoxi-Gel-Säulen (Polymyxin B-konjugierte Säulen, Perbio Science, Bonn, Deutschland) entsprechend den Herstellerinformationen. Der Limulus Amöbozyten-lysierte Gel-Gerinnungstest (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) ermittelte vor dem Einsatz der finalen ALP-Aufbereitung in allen analysierten Proben eine Endotoxinkonzentration unter der Nachweisgrenze von 0,05 U/ml.

4.3. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie zur Analyse der Mikrozirkulation der Synovialschleimhaut des Kniegelenkes

4.3.1. Mikrozirkulationsmodell des Kniegelenkes

Zur Darstellung der synovialen Mikrozirkulation mittels der in vivo Multifluoreszenzmikroskopie nutzten wir das Kniegelenksmodell, welches erstmalig durch Veihelmann und Mitarbeiter beschrieben wurde (Veihelmann et al. 1998). Dieses neue Modell ermöglicht die Visualisierung und quantitative in vivo Analysen der intraartikulären Mikrozirkulation des synovialen Fettgewebes im Kniegelenk der Maus. Nach partieller Hautresektion und transverser Durchtrennung der Patellarsehne erhält man freie Sicht auf den „Hoffa-Fettkörper“, einem intraartikulären Fettgewebekörper, und die darunter befindliche Synovialis (Abb. 3). Die Synovialis zeichnet sich durch eine hohe Kapillardichte mit wenigen postkapillaren Venolen aus (Abb. 4). Die intravitale Mikroskopie ermöglicht nach Applikation von Fluoreszenzmarkern die quantitative mikrozirkulatorische in vivo Analyse des Synovialgewebes ohne Eröffnung der Gelenkkapsel. Unter Verwendung verschiedener Fluochrome kann das Fließverhalten des Blutes mit Unterscheidung zwischen Blutplasma, Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten in dem Gefäßnetzwerk beurteilt werden.

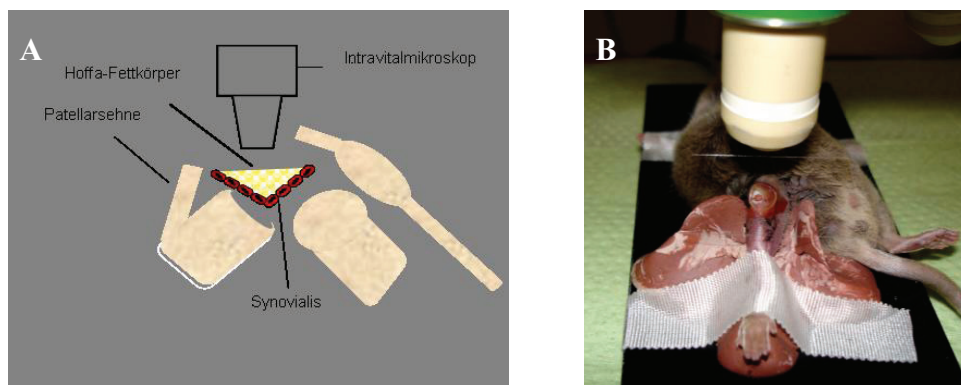


Abbildung 3: (A) Schematische Seitenansicht (Veihelmann et al. 1998) und (B) Aufnahme nach chirurgischer Präparation des Kniegelenksmodells zur Intravitalmikroskopie in der Maus.

4.3.2. Aufbau der intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Zur Erhebung der intravitalmikroskopischen Daten wurde ein hochauflösendes Zeiss Axiotech Stereomikroskop mit Auflicht-Einrichtung verwendet (Zeiss, Jena Deutschland). Die Epi-Illuminations-Mikroskopie beinhaltet eine 100W Quecksilberlampe, adaptiert an ein Blau-(510-560nm/>505nm) und Grün-(510-560nm/>575nm) Filtersystem. Für Übersichtsaufnahmen wurde ein x4 Objektiv (Numerische Apertur (NA) 0.12) mit langem

Arbeitsabstand verwendet. Zur Bestimmung der funktionellen Kapillardichte wurden pro Tier vier repräsentative Gesichtsfelder mit einem x40 Wasserimmersions-Objektiv (NA 0.75; Zeiss) aufgenommen. Die Aufnahmen von 3 bis 6 postkapillaren Venolen (18-40µm im Durchmesser) erfolgten unter Verwendung eines x20 Objektivs (NA 0.32).

Um die Qualität der Mikroskopie im Hinblick auf quantitative Analysen mikrozirkulatorischer Parameter sicherzustellen, nutzten wir zur Kontrastverbesserung die Marker Rhodamin 6G und Fluoresceinisothiocyanat-markiertes Dextran (FITC-Dextran), die über einen zentralvenösen Katheter appliziert wurden.

Der Plasmamarker FITC-Dextran diene der Darstellung des Intravasalraumes und der damit verbundenen besseren Beurteilbarkeit mikrohämodynamischer Parameter in Kapillaren und postkapillaren Venolen. FITC ist ein kleines organisches Molekül und liegt typischer Weise an Proteine über primäre Amine gebunden vor. Somit wurde ursprünglich durch FITC der Proteinanteil des Plasmas-die zirkulierenden Blutzellen sowie die Endothelzellen ausgenommen-gefärbt (Bonney et al. 1977). Heutzutage wird FITC bereits in gebundener Form an Dextran, einem hochmolekularen, wasserlöslichen Polypeptid, das auch als Plasmaersatzmittel dient, appliziert. Zur Visualisierung des Blutplasmas wurde den Mäusen eine einmalige Injektion von 5% FITC-Dextran (MG 150kd, 0,2ml i.v., Sigma, Deisenhofen, Deutschland) verabreicht. FITC-Dextran wird durch Zwischenschalten eines Blaufilters in den Strahlengang angeregt und emittiert ein Licht mit einer mittleren Wellenlänge von 525nm. Durch die Kontrastanhebung des Plasmas zeichnen sich die perfundierten Gefäße deutlich vom wesentlich dunkleren umgebenden Gewebe ab (Lehr et al. 1990; Vollmar et al. 2001; Menger et al. 2002).

Zur in vivo Visualisierung der Leukozyten wurde der Fluoreszenzmarker Rhodamin 6G (0,1%, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) als i.v. Bolus von 0,2 mg/kg unmittelbar vor den Aufnahmen injiziert. Dieser lipophile Farbstoff ist positiv geladen und reichert sich in Abhängigkeit vom Membranpotential in der Mitochondrienmembran an. Somit werden Zellen ohne Mitochondrien, wie z. B. Erythrozyten nicht angefärbt (Batz et al. 1995). Durch das Einbringen eines Grünfilters in den Strahlengang wird Rhodamin 6G angeregt. Die Kontrastanhebung der Leukozyten ermöglicht gezielte Analysen zum leukozytären Fließverhalten.

Alle beobachteten Mikroskopiebilder wurden für die offline Evaluierung mittels einer CCD-Kamera (FK 6990A-IQ, Pieper, Berlin, Deutschland) mit einer Geschwindigkeit von 50 Halbbildern pro Sekunde durch ein Videosystem (S-VHS Panasonic AG 7350-E, Matsushita, Tokio, Japan) aufgenommen. Das Zwischenschalten eines Videozeitgenerators (VTG-33, For-

A, Japan) ermöglichte durch Dokumentation von Versuchsnummer, -dauer und -datum sowie Aufnahmezeit eine exakte Zeit- und Versuchszuordnung.

Die Auswertung sämtlicher Videosequenzen wurde offline, d.h. nach Beendigung der intravitalen Mikroskopie durchgeführt. Hierdurch konnte der Untersuchungszeitraum und damit die Belastung für das Versuchstier auf ein Minimum reduziert werden.

4.3.3. Mikrozirkulatorische Analyse

Nach Versuchsende erfolgte die Auswertung der aufgezeichneten synovialen Videosequenzen mit Hilfe des computerassistierten Bildverarbeitungssystem CapImage (Version 7.4, Dr. Zeintl Software, Heidelberg, Deutschland), einer speziellen Software zur Mikrozirkulationsanalyse. Folgende mikrohämodynamische Parameter der Kniegelenkschleimhaut konnten anhand dieses Auswertungssystems quantitativ erarbeitet werden.

Kapillaren. Die Kapillaren kamen durch den Plasmamarker FITC-Dextran exakt zur Darstellung. Für die Bestimmung des Kapillardurchmessers wurden pro Gesichtsfeld 10-15 Kapillaren ausgewählt und durch eine manuell, senkrecht zum Gefäßverlauf gesetzte Linie der Gefäßdurchmesser bestimmt. Der mittlere Gefäßdurchmesser wurde aus den gemessenen Einzelwerten als arithmetischer Mittelwert berechnet.

Die *funktionelle Kapillardichte* (FCD, cm/cm^2) errechnet sich aus der Gesamtlänge der Kapillaren mit sichtbarer Erythrozytenperfusion pro Beobachtungsfläche und gilt als Maß für die nutritive Perfusion des Gewebes (Nolte et al. 1995). Während des mehrmaligen Abspielens der Videosequenz eines Gesichtsfeldes wurden alle perfundierten Kapillaren manuell nachgezeichnet und in cm/cm^2 angegeben (Abb. 4C).

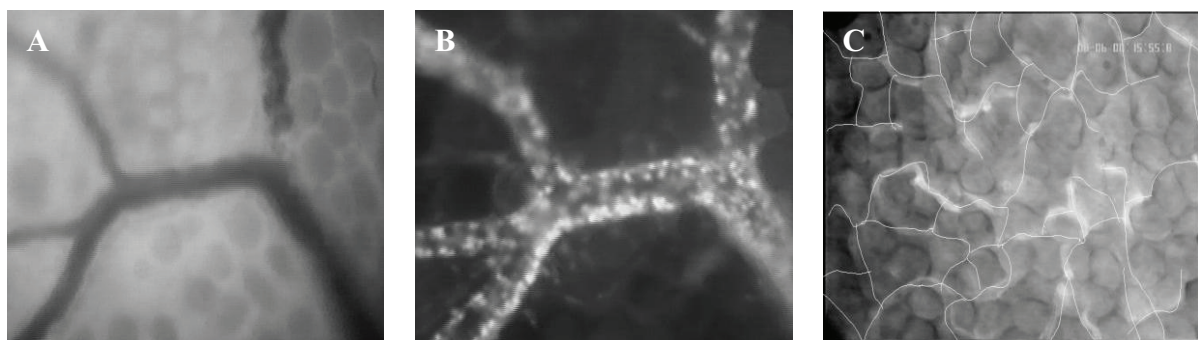


Abbildung 4: Repräsentative intravitalmikroskopische Übersichtsaufnahmen der Synovialschleimhaut des Kniegelenkes mit klassischem wabenartigen Kapillarnetz und dem Zusammenfluß einer postkapillaren Venole (A: ohne Filtersystem, B: Visualisierung der Leukozyten im Grünfilter; Vergrößerung x376) sowie repräsentative intravitalmikroskopische Aufnahme des Kapillarnetzwerkes der Kniegelenksschleimhaut (C, Vergrößerung x810) mit Bestimmung der funktionellen Kapillardichte (FCD, cm/cm^2) durch manuelles Nachzeichnen aller perfundierten Kapillaren pro Gesichtsfeld.

Venolen. In den postkapillaren Venolen erfolgte, unterstützt durch die beiden beschriebenen Fluoreszenzmarker, die Visualisierung und Beurteilung der Blutzellfließgeschwindigkeit sowie der leukozytären Endothelzell-Interaktion.

Die Bestimmung der *Blutzellfließgeschwindigkeit* erfolgte mittels der computerassistenten Line-Shift-Methode (Klyscz et al. 1997). Entlang der Flussrichtung wurde hierzu innerhalb definierter Gefäße im Zentralstrom eine Messlinie festgelegt und anschließend unter Abspielen des Videobandes für ca. 12s in Echtzeit ein Grauwertprofil erstellt. Daraus erzeugt das Programm ein Line-Shift-Diagramm mit unterschiedlichen Grauabstufungen, die sich durch Plasmalücken bzw. Erythrozyten entlang der Messlinie erklären. Aus der Steigung dieser Linien wird abschließend die Blutzellfließgeschwindigkeit in $\mu\text{m/s}$ bestimmt (Abb. 5).

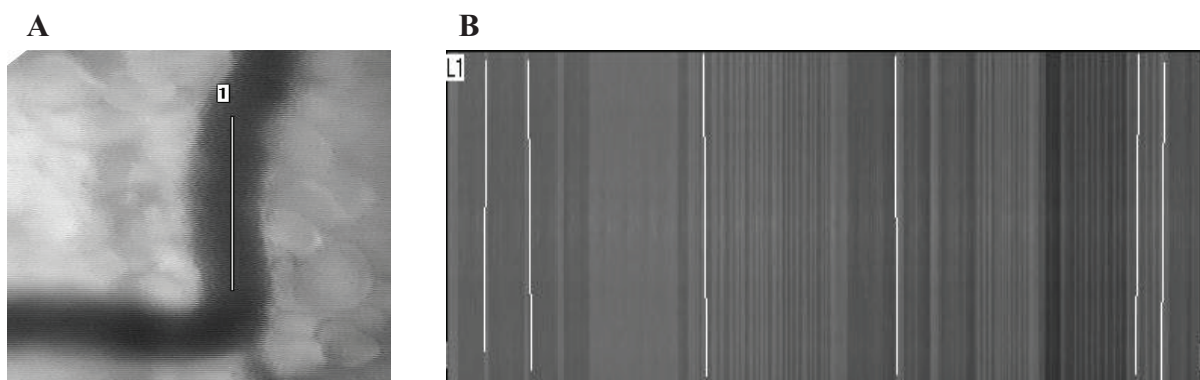


Abbildung 5: Intravitalmikroskopische Aufnahme einer Venole (A, Vergrößerung x376) in der Synovialschleimhaut des Kniegelenkes mit einer definierten Messlinie (1) zur Erfassung der Blutzellfließgeschwindigkeit. Nach Abspielen des Videobandes für ca. 12s entsteht das Line-Shift-Diagramm (B). Aus der Steigung der Messlinien (weiße Linien) wird die Geschwindigkeit des Blutflusses ($\mu\text{m/s}$) errechnet.

Nach der *in vivo* Anfärbung zirkulierender Leukozyten mittels Rhodamin 6G erforderte die Analyse des leukozytären Fließverhaltens zunächst die Bestimmung von *Gefäßdurchmesser, Gefäßlänge und Gefäßoberfläche* der postkapillaren Venolen. Zur Ermittlung des Gefäßdurchmessers wurden zwei exakt am Gefäßrand liegende Punkte bestimmt, deren Verbindungslinie eine Gerade senkrecht zum Gefäßverlauf ergab und deren Abstand berechnet wurde. Dieser Vorgang wurde an drei verschiedenen Gefäßabschnitten wiederholt und schließlich der Mittelwert gebildet. Die Gefäßlänge konnte analog dazu ermittelt werden mit dem Unterschied, dass die zwei Punkte an den Anfang bzw. das Ende des untersuchten Gefäßabschnittes gesetzt wurden. Die Verbindungslinie ergab in diesem Fall eine Parallele zum Gefäßverlauf, deren Länge ebenfalls errechnet wurde (Abb. 6A). Unter der Annahme einer zylindrischen Gefäßgeometrie konnte mit der Formel Zylinderfläche $F = l \times U$ (U = Zylinderumfang = $\pi \times d$; d = Gefäßdurchmesser; l = Länge des Gefäßes) aus den ermittelten Parametern die endotheliale Gefäßoberfläche (mm^2) berechnet werden.

Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen. Durch wiederholtes Abspielen einer ausgewählten Videosequenz wurden die in vivo markierten Leukozyten in einem festgelegten Gefäßsegment 20s lang ausgezählt und entsprechend ihrer Interaktion mit dem mikrovaskulären Endothel folgendermaßen eingeteilt:

Frei fließende Leukozyten bewegen sich im Zentralstrom der Gefäße mit nahezu gleicher Geschwindigkeit wie Erythrozyten. Rollende Leukozyten, kurz (*roller*) genannt, wurden als mobile, nicht adhärenente Zellen definiert, die sich im Vergleich zum Zentralstrom mit deutlich geringerer Geschwindigkeit (<40% der Zentralstromgeschwindigkeit) bewegen und temporär mit der Endothelwand interagieren. Leukozyten, die über einen Zeitraum von mindestens 20s oder länger am Endothel der venösen Gefäßwand hafteten und sich nicht bewegten, wurden als adhärenente Leukozyten (*sticker*) definiert.

Der visuellen Unterstützung diente eine quer zum Gefäßverlauf festgelegte Linie (Abb. 6B). Gezählt wurden im ersten Durchlauf alle Leukozyten, die diese Linie in einem Zeitraum von 20s passierten. Daraus ergab sich der sogenannte Leukozytenflux, angegeben in Zellen/20s. Durch eine zweite Zählung von Leukozyten, welche sich mit einer Geschwindigkeit von weniger als 40% in Bezug auf die im zentralen Blutstrom befindlichen Leukozyten fortbewegen, wurde die Anzahl der *roller* bestimmt. Die Angabe der rollenden Leukozyten erfolgte als Prozentsatz zum gesamten Leukozytenflux. Vor dem erneuten Abspielen der Videosequenz wurden die Leukozyten in dem definierten Gefäßabschnitt zunächst manuell markiert (Abb. 6C). Zellen, die sich während des Beobachtungszeitraumes von 30s nicht vom Endothel gelöst haben, wurden als adhärenente Leukozyten gezählt. Aus der Anzahl der *sticker* pro Quadratmillimeter Gefäßoberfläche, die zuvor aus Länge und Durchmesser des untersuchten Gefäßabschnitts berechnet wurde, konnte die Leukozytenadhärenenz in Zellen/mm² ermittelt werden.

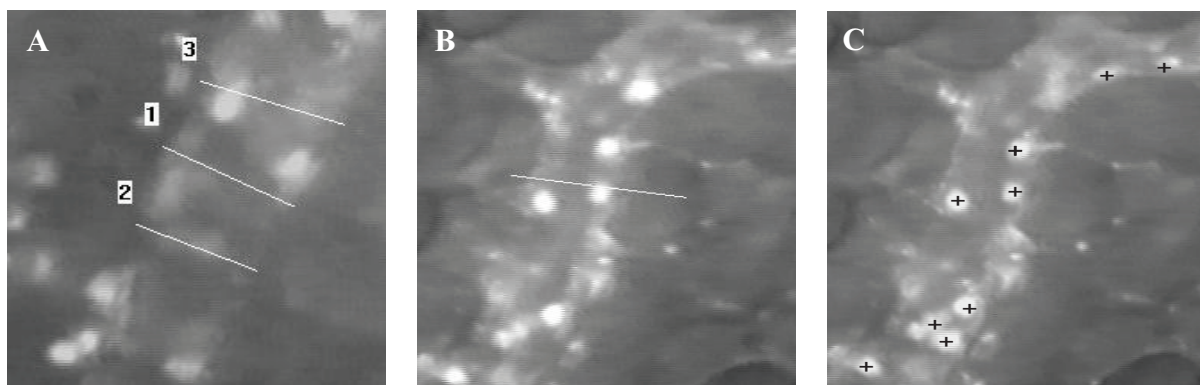


Abbildung 6: Repräsentative intravitalmikroskopische Aufnahmen postkapillarer Venolen (Vergrößerung x376) in der Synovialschleimhaut des Kniegelenkes. A: Ermittlung des Gefäßdurchmessers in einer Venole; B: Venole mit einer Hilfslinie zur Zählung des Leukozytenflux und der rollenden Leukozyten; C: Venole mit markierten Leukozyten (+) zur Zählung der Leukozytenadhärenenz.

4.4. Experimenteller Aufbau

4.4.1. Vorbehandlung der Mäuse-Versuchsabschnitt I

Ziel der initialen Studie war die Charakterisierung der synovialen Mikrozirkulation im Kniegelenk der Maus in den Modellen der CIA und CAIA. Dabei wurden die mikrozirkulatorischen Untersuchungen noch vor dem Auftreten klinischer Symptome durchgeführt. Nach Randomisierung und Zuordnung zu den einzelnen Versuchsgruppen erfolgte die Arthritisinduktion in FVB/NJ, TCR und DBA1/J Mäusen nach folgendem Ablauf: *Kollagen-induzierte Arthritis (CIA)*. Sechs bis acht Wochen alte Mäuse (12-14g) der drei beschriebenen Mausstämme wurden mit 125µg bovinen CII, gelöst in CFA, durch eine intradermale Applikation im Bereich der Schwanzbasis immunisiert. Jedem Mausstamm wurde eine Kontrollgruppe zugeordnet. Den Kontrolltieren wurden äquivalente Volumina von CFA injiziert. Nach sechs Wochen vor bzw. mit Beginn erster arthritischer Veränderungen wurden die Mäuse den Versuchen zugeführt.

Die *Anti-Kollagen II Antikörper-induzierte Arthritis (CAIA)* wurde nur in Tieren des DBA1/J Stamms induziert. Die Immunisierung der 6-8 Wochen alten männlichen Mäuse (Wildtyp, 18-24g) erfolgte durch einen Cocktail, welcher aus jeweils 4,5mg der monoklonalen Antikörper M2.139 und C2C1 bestand. Daraus resultierte ein Gemisch mit einer Gesamtmenge von 9mg und einem Volumen von 750µl, das einmalig i.v. über die Schwanzvene appliziert wurde. Als Kontrolle dienten PBS-behandelte Tiere, denen äquivalente Volumina PBS über die Schwanzvene verabreicht wurden. Die Versuche erfolgten 24 Stunden nach Arthritisinduktion.

Insgesamt wurden 8 Gruppen (n=7, pro Gruppe) intravitalmikroskopisch untersucht und ergänzend klinisch sowie histologisch beurteilt (Tab. 1).

Modell	Mausstamm	Arthritisinduktion/ Kontrolle		
		Zeitpunkt 0	24 Stunden	6 Wochen
CIA	FVB/NJ	125 µg Kollagen II/ CFA		IVM IVM
	TCR	125 µg Kollagen II/ CFA		IVM IVM
	DBA1/J	125 µg Kollagen II/ CFA		IVM IVM
CAIA	DBA1/J	750µg K-mAb/ PBS	IVM IVM	

Tabelle 1: Tabellarische Darstellung des Studiendesigns der mikrozirkulatorischen Analyse der Kniegelenksschleimhaut in FVB/NJ, TCR, und DBA1/J Mäusen an den Modellen der CIA und CAIA. Die Intravitalmikroskopie (IVM) erfolgte 6 Wochen nach Arthritisinduktion durch Kollagen II-Exposition oder 24h nach Anti-Kollagen II Antikörper-Exposition (K-mAb), im Vergleich zu CFA bzw. PBS-behandelten Kontrolltieren.

4.4.2. Vorbehandlung der Mäuse-Versuchsabschnitt II

Im zweiten Versuchsabschnitt wurde der Effekt von ALP auf die Mikrozirkulation der Kniegelenksschleimhaut am Modell der CAIA analysiert.

Hierfür wurden 6-8 Wochen alte männliche DBA/1J Mäuse (Wildtyp, 18-24g), konkordant zum Versuchsabschnitt I, durch eine einmalige i.v. Applikation (750µl) in die Schwanzvene, bestehend aus einem Cocktail aus 2 monoklonalen Antikörpern (je 4,5mg; M2139 und C2C1) immunisiert. Direkt im Anschluß erfolgte die i.p. Injektion von 100µg oder 300µg rekombinanter ALP. Als Kontrolle dienten PBS-behandelte Tiere, denen äquimolare Volumina der Trägersubstanz PBS i.p. injiziert wurden.

Für die Intravitalmikroskopie wurden 3 Zeitpunkte festgelegt. Nach 6, 24 oder 72 Stunden wurden die Mäuse (n=7, pro Gruppe) narkotisiert und die Synovialis für die Fluoreszenzmikroskopie exponiert. Die Tiere, welche nach 72 Stunden untersucht wurden, erhielten zur Aufrechterhaltung der systemischen ALP-Konzentration (Halbwertszeit von ALP ca. 6 Stunden) nach 24 Stunden eine erneute 100µg ALP-Injektion. Bei den entsprechenden Kontrollmäusen erfolgte eine zweite PBS-Applikation. In der hochdosierten ALP-Gruppe (ALP 300µg) verzichteten wir auf den späten Untersuchungszeitpunkt von 72 Stunden (Abb. 7).

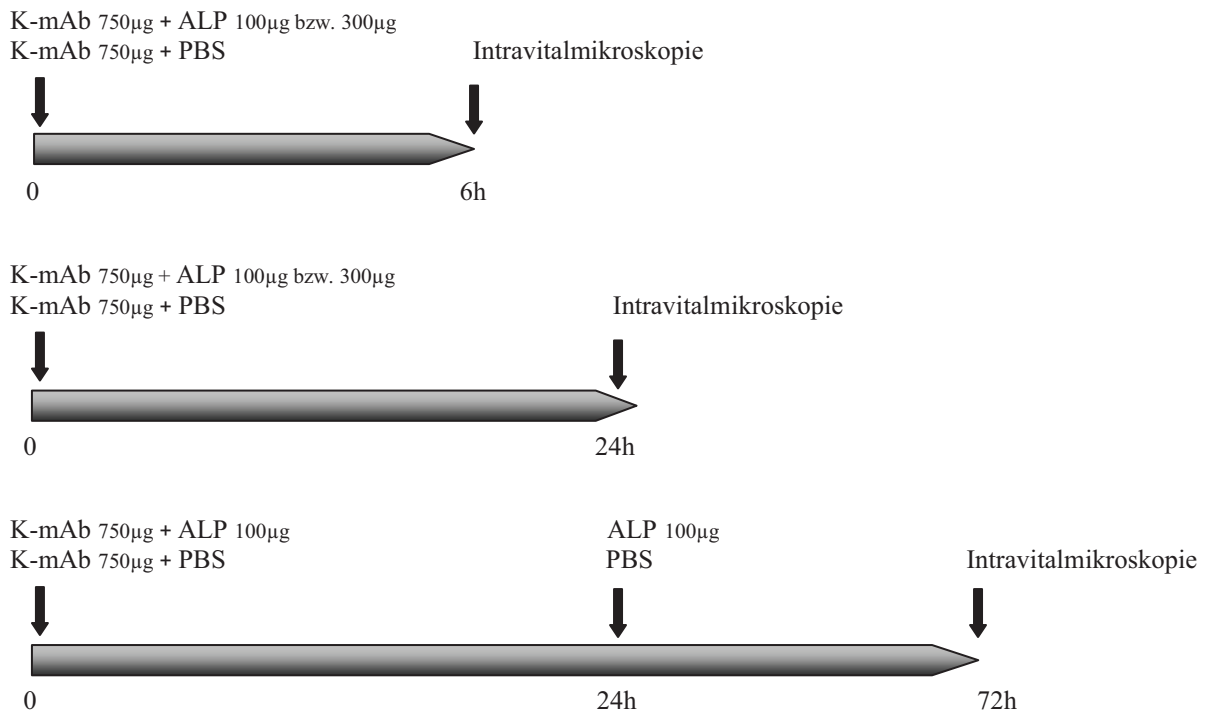


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Studiendesigns zur in vivo Wirksamkeit von ALP auf die synoviale Mikrozirkulation im Modell der CAIA der Maus. Zeitgleich zur Arthritisinduktion (Anti-Kollagen II Antikörper-Exposition (750µl)) erhielten die DBA1/J Mäuse ALP (i.p.) in der Dosierung von 100µg oder 300µg, bzw. die Kontrolltiere PBS. Die Intravitalmikroskopie des Kniegelenkes erfolgte nach 6, 24 oder 72 Stunden, wobei die 72h Tiere erneute ALP(100µg) bzw. PBS-Applikationen nach 24h erhielten.

4.4.3. Versuchsablauf und mikrochirurgische Präparation

Narkose. Sämtliche Untersuchungen wurden unter Anästhesie der Versuchstiere bei vorhandener Spontanatmung durchgeführt. Die Mäuse wurden initial mittels i.p. Injektion von Ketamin (90mg/kg/KG) und Xylacin (25mg/kg/KG) anästhesiert. Zur Überprüfung und Sicherstellung der Narkosetiefe diente der Kornealreflex. Die Aufrechterhaltung der Narkose wurde durch weitere i.p. Ketamininjektionen in Abständen von ca. 20 Minuten sichergestellt. Nach erfolgreicher Anästhesie wurde das Versuchstier gewogen und die Haare in der Regio colli sowie am rechten Kniegelenk entfernt. Die Mäuse wurden auf einer Heizplatte platziert, um eine konstante Körpertemperatur von 37°C zu garantieren, welche rektal mit einer Temperatursonde kontrolliert wurde (YSI Re-usable Temperature Probe, Fa. YSI Inc., Yellow Springs/Ohio USA).

Zentralvenöser Katheter. Zur Applikation der Fluoreszenzfarbstoffe war die Anlage eines venösen Katheters erforderlich. Nach einer ca. 1cm langen Hautinzision oberhalb der Clavicula wurde die Vena jugularis interna dextra atraumatisch freipräpariert, kranial ligiert und kaudal mit einer Schlinge versehen (Seidenfäden, 5–0). Daraufhin konnte das Gefäß eingeschnitten und der Polyethylenkatheter (Venenkatheter: Innendurchmesser 0,5 mm,

Aussendurchmesser 0,9 mm; Braun AG, Melsungen, BRD) gelegt werden. Der venöse Katheter wurde von der Punktionsstelle aus bis in die Vena cava superior vorgeschoben. Die Durchgängigkeit des Polyethylenkatheters sicherte eine konstante Infusion von 0,9%iger NaCl-Lösung (0,5ml/kgxh). Zur Befestigung wurde die kaudale Schlinge um das Gefäß mit dem intravasal liegenden Katheter zugezogen und geknotet.

Kniegelenkspräparation. Um während der Kniegelenkspräparation eine Immobilisation der Extremität zu gewährleisten, wurde das rechte Kniegelenk in Flexionsstellung fixiert. Distal der Patellarsehne erfolgte ein V-förmiger Hautschnitt, der ein seitliches Umklappen der mobilisierten Haut ermöglichte. Nach vorsichtiger Darstellung der Patellarsehne konnte diese am distalen Pol durch einen transversalen Schnitt durchtrennt werden. Um eine direkte Sicht auf den Hoffa-Fettkörper und der darunter befindlichen Synovialis zu erlangen, mussten die beiden Anteile der Patellarsehne nach proximal verlagert werden (Abb. 8). Der Austrocknung des freigelegten Hoffa-Fettkörpers wirkte man mit einer sofortigen Superfusion von auf 37°C angewärmter physiologischer Kochsalzlösung (Thomaejonin®, Thomas, Biberach) entgegen. Ein Deckgläschen (21x26mm, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland), welches durch die Kniegelenkskapsel gestützt wurde, diente als transparente und plane Abdeckung des Präparationsgebietes.

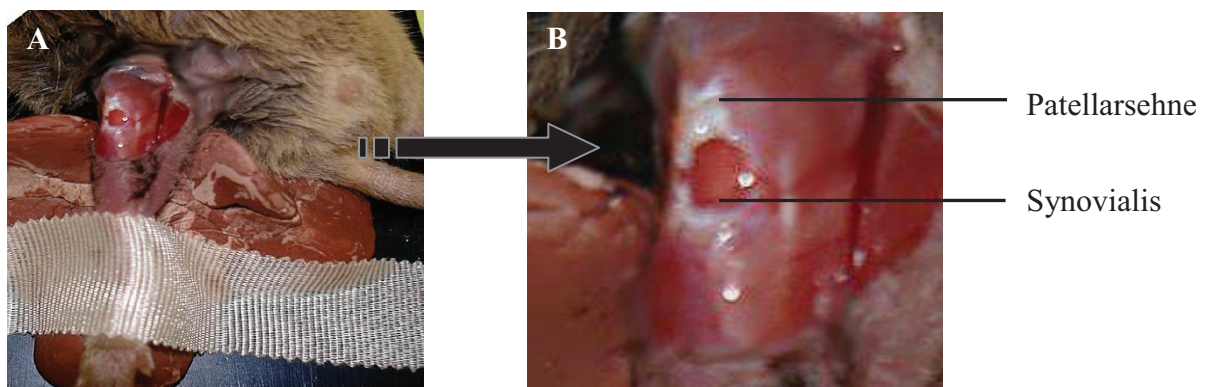


Abbildung 8: Übersichtsaufnahme (A) und vergrößerter Bildausschnitt (B) nach partieller Hautresektion und Durchtrennung der Patellarsehne mit Blick auf die Synovia und den distal liegenden Hoffa-Fettkörper.

Einer kurzzeitigen Stabilisierungsphase folgte die Applikation der Fluoreszenzfarbstoffe (FITC-Dextran, Rhodamin 6G) mit anschließender in vivo Mikroskopie des synovialen Gewebes. Nach Abschluss der intravitalmikroskopischen Aufnahmen fand eine venöse Blutentnahme statt. Die Mäuse wurden durch eine Überdosis Anästhetikum getötet und nach Eintreten des Exitus die untersuchten Kniegelenke zur histologischen Aufarbeitung entnommen.

4.5. Blutuntersuchung

Am Ende der Versuche wurden Blutproben zur Laboranalyse durch Pfortaderpunktion gewonnen. Die Erstellung des Blutbildes erfolgte mittels eines automatischen Zellzählers (Sysmex KX21, Sysmex GmbH, Norderstedt, Deutschland).

4.6. Klinische Evaluation der Arthritis

Zur Beurteilung der Ausprägung der Arthritis wurde jeweils vor Versuchsbeginn ein klinischer Score, welcher von Nandakumar und Mitarbeiter beschrieben ist, erhoben. (Nandakumar et al. 2003). Der Score basiert auf der Anzahl entzündeter Gelenke pro Pfote, wobei die Inflammation durch Schwellung und Rötung definiert ist. Pro Pfote kann ein Score von maximal 15 Punkten erreicht werden, der sich wie folgt zusammensetzt: 1 Punkt pro entzündete Zehe (Phalangealgelenke), 5 Punkte bei Entzündungen im Vorfuß (Metacarpal-/Metatarsalgelenke) und 5 Punkte bei inflammatorischen Knöchelgelenken der Vorder- oder Hinterpfoten. Daraus ergibt sich ein Maximalscore von 60 Punkten. Die Evaluation erfolgte durch unabhängige und verblindete Untersucher.

4.7. Histologie

Zur histologischen Beurteilung wurden am Ende der jeweiligen Versuche die Kniegelenke entnommen und in 4%igem Phosphat gepuffertem Formalin für 2-3 Tage fixiert. Einer 6-wöchigen Dekalzifizierung der Gelenke in EDTA folgte die Einbettung in Paraffin. Aus den in Paraffin eingebetteten Gewebeblöcken wurden 4µm dicke Schnitte angefertigt und mit Hematoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Zur semiquantitativen Analyse der Kniegelenkspräparate nutzten wir den histologischen Score, welcher von Brackertz et al. beschrieben wurde (Brackertz et al. 1977). Der Score dient zur Beurteilung der inflammatorischen Veränderungen von Synovialis, Knorpel und Knochen. Dabei werden 0 bis 4 Punkte vergeben, die wie folgt charakterisiert sind: 0 = normales Kniegelenk, 1 = vereinzelte mononukleäre Zellen in normaler Synovialis, 2 = perivaskuläre Leukozyteninfiltration, zwei oder mehr synoviale Zellreihen, 3 = dichte Infiltration von Leukozyten, synoviale Hyperplasie, 4 = Synovitis, Pannusformation und Knorpelerosionen. Die histologischen Analysen erfolgten an einem Zeiss Mikroskop (AxioTech vario100HD, Carl Zeiss, Deutschland).

4.8. Statistik

Alle Daten werden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben.

Die statistische Auswertung von Vergleichen zwischen den Gruppen erfolgte bei Normalverteilung der Werte mittels „one way analysis of variance“ (ANOVA) mit Anknüpfung des Student's t-Test für den unverbundenen Paarvergleich und anschließender Korrektur des alpha-Fehlers nach Bonferroni. Falls eine Normalverteilung der Werte ausgeschlossen werden konnte, kam beim Gruppenvergleich die Kruskal Wallis Varianzanalyse und beim Paarvergleich der Mann-Whitney Rang Summen Test zum Einsatz. Sämtliche statistische Tests erfolgten unter Verwendung der Software SigmaStat 3.0 (Jandel, San Rafael, CA, USA). Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ festgelegt.

5. Ergebnisse

5.1. Versuchsabschnitt I

5.1.1. Mikrozirkulation der Kniegelenke von arthritischen Mäusen

Die Mikrozirkulation der Synovialschleimhaut des Kniegelenkes konnte mittels intravitaler Multifluoreszenzmikroskopie nach i.v. Gabe des Plasmamarkers FITC-Dextran (5%), welcher sich aufgrund eines hohen Molekulargewichtes (MG 150.000D) durch eine nur geringe Extravasation auszeichnet, kontrastreich dargestellt werden. Hierbei konnten das klassische wabenartige kapillare Netzwerk sowie die versorgenden Arteriolen und drainierenden Venolen in der Synovialis visualisiert werden. Dies war zu allen Untersuchungszeitpunkten sowohl in arthritischen als auch in nicht-arthritischen Tieren vergleichbar möglich.

5.1.1.1. Mikrovaskuläre Perfusion der Synovialschleimhaut

Die hohe mikrovaskuläre Perfusion der Synovialis, verbunden mit einem dichten Kapillarnetz, sind entscheidende Kriterien für die effiziente Versorgung des gefäßlosen Gelenkknorpels.

Funktionelle Kapillardichte. Die Kapillaren werden durch den Plasmamarker FITC-Dextran kontrastreich dargestellt (Abb. 9). Alle Mausstämme zeigten eine hohe funktionelle Kapillardichte. Die Anzahl der perfundierten Kapillaren lag nach CII-Immunisierung und unter Kontrollbedingungen zwischen 298-378cm/cm². Interessanterweise tendierten arthritische Tiere (CIA) zu einer reduzierten kapillaren Dichte im Vergleich zu den CFA-behandelten Mäusen. Im Gegensatz dazu war die funktionelle kapillare Dichte in der DBA1/J Maus nach Anti-CII Antikörper-Exposition signifikant im Vergleich zu den Kontrolltieren erhöht (Abb. 10).

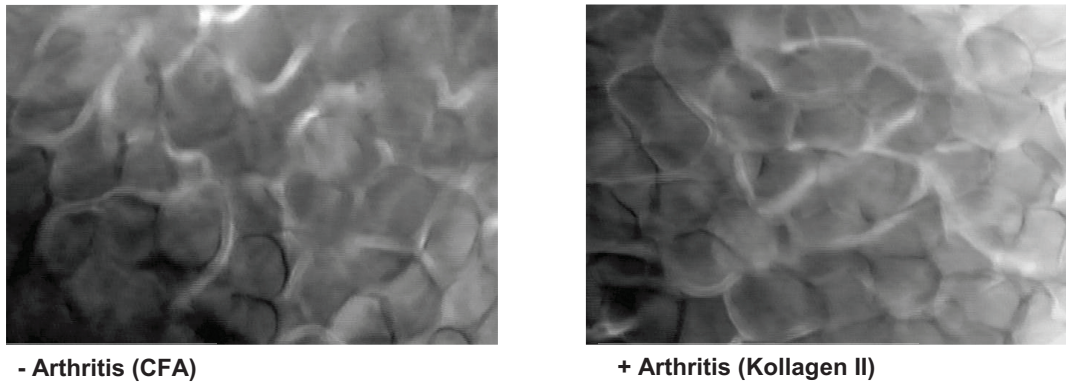


Abbildung 9: Repräsentative intravitalmikroskopische Gesichtsfelder des Kapillarnetzes der Synovialschleimhaut nach Arthritisinduktion mittels Kollagen II-Exposition im Vergleich zur CFA-Behandlung (Kontrolle) in der DBA1/J Maus (Vergrößerung x810).

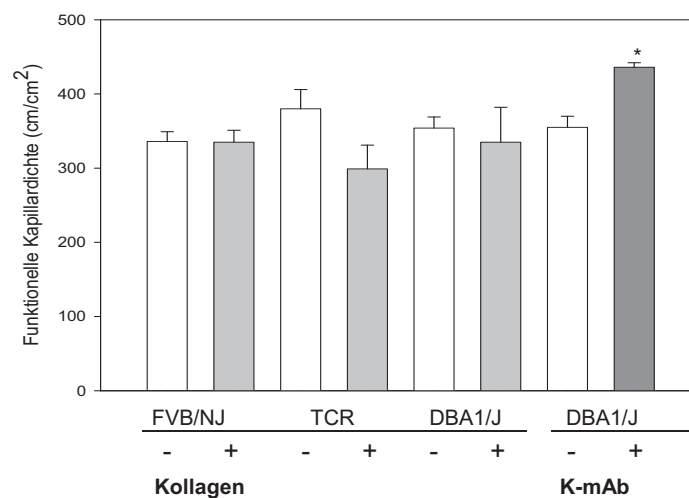


Abbildung 10: Mikrozirkulation der Synovialschleimhaut in zwei Tiermodellen zur RA. Funktionelle Kapillardichte in FVB/NJ, TCR, und DBA1/J Mäusen nach Kollagen II (Kollagen) bzw. Anti-Kollagen II Antikörper-Exposition (K-mAb) im Vergleich zu CFA/PBS-behandelten Kontrolltieren. Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie der Kniegelenke erfolgte 6 Wochen nach Kollagen II/CFA-Immunisierung bzw. 24 Stunden nach Anti-Kollagen II Antikörper/PBS-Exposition. Die Darstellung der Daten erfolgte als Mittelwerte und SEM bei n=7 Tieren pro Gruppe. *p<0,05 vs PBS/DBA1/J, ANOVA, post hoc Vergleichstest.

Blutzellfließgeschwindigkeit und Blaulichtepiillumination in synovialen Venolen. Die postkapillaren Venolen konnten mittels FITC-Dextran exakt dargestellt und analysiert werden. Die erythrozytäre Geschwindigkeit betrug bei den nicht-arthritischen FVB/NJ und DBA1/J Kontrollmäusen durchschnittlich 1000µm/sec. In der TCR-Kontrollmaus wurde eine deutlich höhere Geschwindigkeit mit Werten bis zu 1700µm/sec ermittelt. Nach Arthritisinduktion war die Blutzellfließgeschwindigkeit in den synovialen Venolen reduziert. Im FVB/NJ und DBA1/J Mausstamm bewirkte die Arthritisinduktion eine Reduktion der Blutzellfließgeschwindigkeit zwischen 20-44% im Vergleich zu den nicht-arthritischen Kontrolltieren (Abb. 11). Deutlich verlangsamt zeigte sich die Erythrozytenfließgeschwindigkeit in der TCR Maus nach Arthritisinduktion mittels CII-Exposition. Im

Vergleich zu den TCR-Kontrolltieren war die Blutzellfließgeschwindigkeit um über 70% signifikant reduziert.

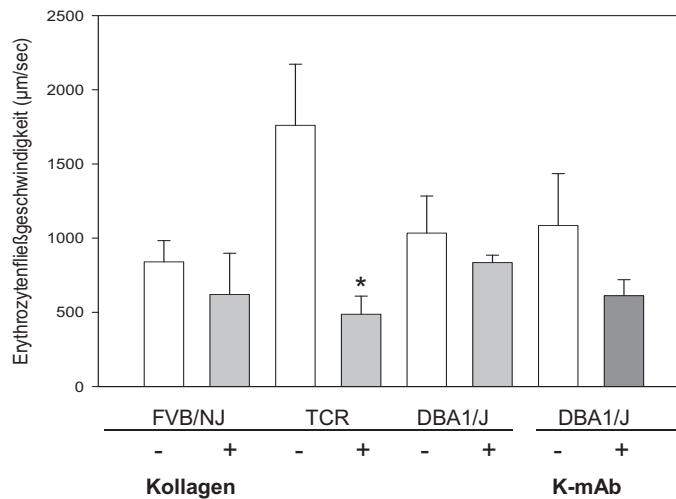


Abbildung 11: Mikrozirkulation der Synovialschleimhaut in zwei Tiermodellen zur RA. Venuläre Erythrozytenfließgeschwindigkeit (V_{RBC} in $\mu\text{m/sec}$) der synovialen Kniegelenksschleimhaut in FVB/NJ, TCR und DBA1/J Mäusen nach Kollagen II (Kollagen) bzw. Anti-Kollagen II Antikörper-Exposition (K-mAb) im Vergleich zu CFA/PBS-behandelten Kontrolltieren. Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie der Kniegelenke erfolgte 6 Wochen nach Kollagen II/CFA-Immunisierung bzw. 24 Stunden nach Anti-Kollagen II Antikörper/PBS-Exposition. Die Darstellung der Daten erfolgte als Mittelwerte und SEM bei $n=7$ Tieren pro Gruppe. * $p<0,05$ vs CFA/TCR, ANOVA, post hoc Vergleichstest.

5.1.1.2. Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen in synovialen Venolen

Obwohl die Mäuse noch keine klinischen Zeichen einer arthritischen Kniegelenksentzündung zeigten, repräsentiert das Synovialgewebe in der Intravitalmikroskopie eine charakteristische inflammatorische Zellantwort. Unter Verwendung des Leukozytenmarkers Rhodamin 6G konnte die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in postkapillaren Venolen beurteilt werden.

Leukozytenflux. In gesunden Kontrollmäusen passierten im Zentralstrom durchschnittlich zwischen 10-17 frei fließende Leukozyten in einem Zeitfenster von 20 Sekunden eine postkapillare Venole. Unabhängig vom Mausstamm und vom Arthritismodell war die Zahl der passierenden Leukozyten in allen arthritischen Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren um 11-30% erhöht. Die Antikörperexposition führte insbesondere in der DBA1/J Maus zu einer signifikanten Steigerung der Leukozytenanzahl im Vergleich zur PBS-behandelten Kontrollgruppe. Die Arthritisinduktion bewirkte hier eine Verdopplung der Leukozyten (Abb. 12).

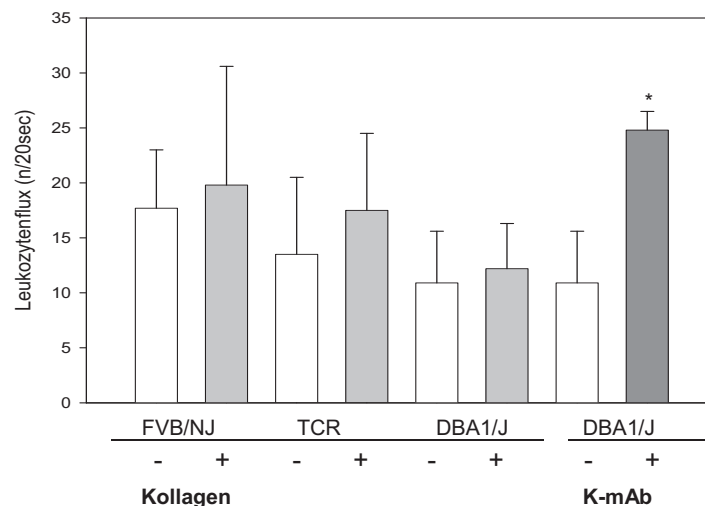


Abbildung 12: In vivo Leukozytenflux in zwei Tiermodellen zur RA. Anzahl der passierenden Leukozyten (n/20sec) in postkapillaren, synovialen Venolen in FVB/NJ, TCR, und DBA1/J Mäusen nach Kollagen II (Kollagen) bzw. Anti-KollagenII Antikörper-Exposition (K-mAb) im Vergleich zu CFA/PBS-behandelten Kontrolltieren. Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie der Kniegelenke erfolgte 6 Wochen nach Kollagen II/CFA-Immunisierung bzw. 24 Stunden nach Anti-Kollagen II Antikörper/PBS-Exposition. Die Darstellung der Daten erfolgte als Mittelwerte und SEM bei n=7 Tieren pro Gruppe. *p<0,05 vs PBS/DBA1/J, ANOVA, post hoc Vergleichstest.

Rollende und adhärenente Leukozyten. Die Arthritisinduktion bewirkte neben einem gesteigerten Leukozytenflux eine Aktivierung der Leukozyten, gefolgt von einer deutlichen Zunahme der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion. Die Mausstämmen TCR und DBA1/J, welche sich durch eine bekannte Arthritisempfindlichkeit auszeichnen, zeigten nach Arthritisinduktion eine signifikant erhöhte Anzahl rollender Leukozyten gegenüber den Kontrollgruppen. In den Arthritis-empfindlichen Kontrollgruppen konnten keine rollenden Leukozyten beobachtet werden. Der Prozentsatz der *rollers* lag nach CII-Exposition bei 52% (DBA1/J) bzw. 48% (TCR). Nach Antikörper-Exposition betrug der Anteil der rollenden Leukozyten zum gesamten Leukozytenflux 29% (Abb. 13A). In der resistenten FVB/NJ Maus trat nach CII-Applikation sowie unter Kontrollbedingungen nur ein geringer Prozentsatz rollender Leukozyten auf.

Die Arthritisinduktion führte in den empfindlichen Mausstämmen nicht nur zu einem prozentualen Anstieg der rollenden Leukozyten im Vergleich zu allen passierenden Leukozyten, sondern auch zu einer deutlichen Steigerung der leukozytären festen Haftung am Endothel. Unter Kontrollbedingungen konnte eine einheitlich niedrige Leukozytenadhäsion mit Werten zwischen 76-153 Zellen/mm² beobachtet werden. Die Induktion der akuten bzw. chronischen Arthritis führte im DBA1/J und TCR Mausstamm zu einem signifikanten Anstieg der adhärenenten Leukozyten. Im Vergleich mit den Kontrollgruppen war die Leukozytenadhärenz um das 6 bis 12-fache signifikant erhöht. In der resistenten FVB/NJ

Maus wurde nach Arthritisinduktion keine Steigerung der leukozytären Adhärenz beobachtet. Sowohl unter Kontrollbedingungen als auch bei der CIA hafteten nur wenige Leukozyten fest am Endothel (Abb. 13B).

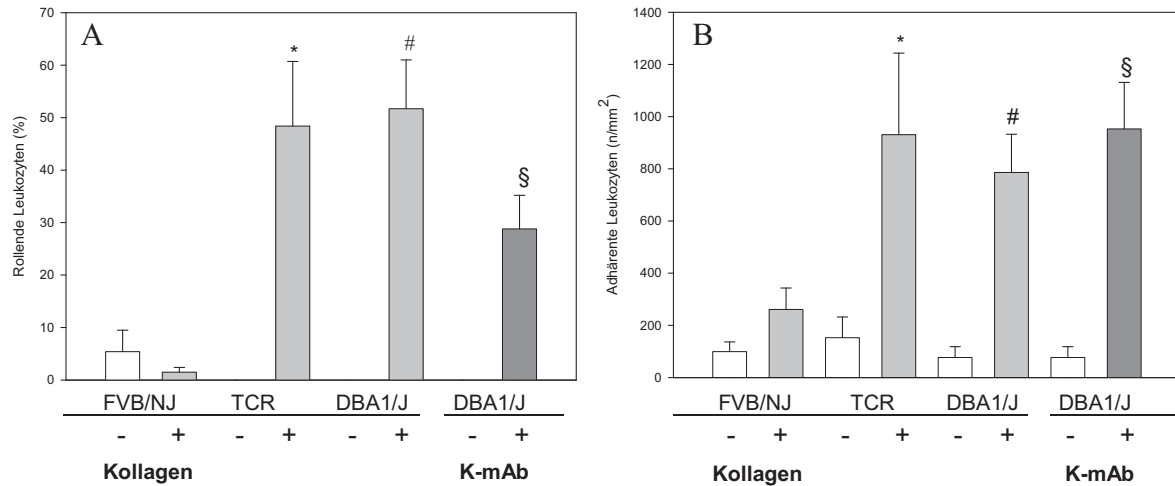


Abbildung 13: In vivo Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in zwei Tiermodellen zur RA. A) Fraktion der rollenden Leukozyten (als Prozentsatz zu allen passierenden Leukozyten) und B) Zahl der adhärenz Leukozyten (Zellen pro mm² endotheliale Oberfläche) der postkapillaren, synovialen Venolen in FVB/NJ, TCR, und DBA1/J Mäusen nach Kollagen II (Kollagen) bzw. Anti-Kollagen II Antikörper-Exposition (K-mAb) im Vergleich zu CFA/PBS-behandelten Kontrolltieren. Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie der Kniegelenke erfolgte 6 Wochen nach Kollagen II/CFA-Immunsierung bzw. 24 Stunden nach Anti-Kollagen II Antikörper/PBS-Exposition. Die Darstellung der Daten erfolgte als Mittelwerte und SEM bei n=7 Tieren pro Gruppe. *p<0,05 vs CFA/TCR, #p<0,05 vs CFA/DBA1/J, §p<0,05 vs PBS/DBA1/J, ANOVA, post hoc Vergleichstest.

5.1.2. Klinischer Score

Bei der klinischen Beurteilung konnten aufgrund der frühen Untersuchungszeitpunkte keine inflammatorischen Gelenkveränderungen im Sinne von Rötung und Schwellung beobachtet werden (Score nach Nandakumar et al. 2003: <0,1). Es bestanden keine Stammunterschiede oder Differenzen innerhalb der Arthritismodelle im Vergleich zu den Kontrollbedingungen (Tab. 2).

	Kollagen		K-mAb	
	-	+	-	+
FVB/NJ	< 0,1	< 0,1	–	–
TCR	< 0,1	< 0,1	–	–
DBA1/J	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1

Tabelle 2: Klinischer Score nach Nandakumar et al. (2003) in FVB/NJ, TCR und DBA1/J Mäusen nach Arthritisinduktion. Der Score wurde 6 Wochen nach Kollagen II (Kollagen)/CFA-Applikation bzw. 24 Stunden nach Anti-Kollagen II Antikörper/PBS-Exposition (K-mAb) vor Durchführung der Intravitalmikroskopie des Kniegelenkes erhoben. Die Daten sind als Mittelwerte bei n=7 Tieren pro Gruppe dargestellt.

5.1.3. Blutanalyse

Die Applikation von Kollagen (CII) bzw. Anti-CII Antikörper, sowie die Gabe der Kontrollsubstanzen CFA oder PBS führte in den Mäusen, unabhängig vom Mausstamm, zu keiner Beeinflussung des Blutbildes. Eine Leukozytose war nach dem Entzündungsstimulus nicht zu verzeichnen (Tab. 3). Die Differenzierung der Leukozyten ergab ebenfalls keine Auffälligkeiten (Ergebnisse nicht gezeigt).

	Kollagen				K-mAb			
	-	+	-	+	-	+	-	+
	FVB/NJ		TCR		DBA1/J		DBA1/J	
Hämoglobin (mmol/l)	6,5 ± 0,4	7,1 ± 0,2	7,1 ± 0,4	7,9 ± 0,1	7,1 ± 0,4	7,7 ± 0,3	7,9 ± 0,1	8,3 ± 0,2
Hämatokrit (%)	36 ± 2	40 ± 1	41 ± 3	46 ± 1	43 ± 3	47 ± 2	48 ± 2	50 ± 1
Thrombozyten (10 ⁹ /l)	851 ± 96	984 ± 210	551 ± 124	743 ± 111	447 ± 73	729 ± 124	654 ± 98	798 ± 141
Leukozyten (10 ⁹ /l)	3,8 ± 0,5	1,8 ± 0,5	2,1 ± 0,8	3,7 ± 0,7	4,4 ± 0,9	4,9 ± 1,0	4,1 ± 1,1	6,0 ± 1,5

Tabelle 3: Blutbild nach Kollagen II (Kollagen) bzw. Anti-Kollagen II Antikörper-Exposition (K-mAb) im Vergleich zu CFA/PBS-behandelten Kontrolltieren in FVB/NJ, TCR und DBA1/J Mäusen. Die Daten sind als Mittelwerte und SEM bei n=7 Tieren pro Gruppe dargestellt. Die Blutentnahme erfolgte nach Abschluß der Inravitalmikroskopie.

5.1.4. Histologischer Score

Die histologischen Schnitte der untersuchten Kniegelenke von FVB/NJ, TCR und DBA1/J Mäusen zeigten eine durchgehend einschichtige Synovialis ohne Knorpel- und Knochenaffektionen (0-1 Punkte nach Brackertz et al. 1977, Ergebnisse nicht gezeigt). Somit wurden keine inflammatorischen Kniegelenksveränderungen im Sinne einer Mehrschichtigkeit der Synovialis beobachtet (Abb. 14). Unabhängig von den Mausstämmen und der Arthritisinduktion konnten nach histologischer Aufarbeitung der Kniegelenke aufgrund der frühen Untersuchungszeitpunkte keine Gruppenunterschiede beobachtet werden.

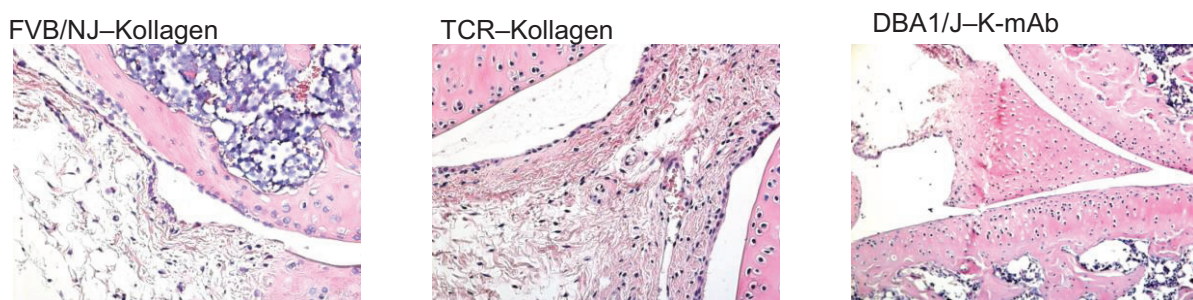


Abbildung 14: Repräsentative Kniegelenkshistologien nach Kollagen II (Kollagen) bzw. Anti-Kollagen II Antikörper-Exposition (K-mAb) in FVB/NJ, TCR, und DBA1/J Mäusen; 6 Wochen (Kollagen) bzw. 24 Stunden (K-mAb) nach Arthritisinduktion (Vergrößerung x20).

5.2. Versuchsabschnitt II

5.2.1. Mikrozirkulation der Kniegelenke von arthritischen Mäusen mit ALP-Vorbehandlung

5.2.1.1. Mikrovaskuläre Perfusion der Synovialschleimhaut

Funktionelle Kapillardichte. Die funktionelle Kapillardichte der synovialen Kniegelenkschleimhaut lag nach Arthritisinduktion (CAIA) während 24 Stunden konstant um 430cm/cm^2 . Die Therapie mit $100\mu\text{g}$ ALP, zeitgleich zur Arthritisinduktion, ergab keine Abweichungen der funktionellen kapillaren Dichte im Vergleich zu den Kontrollbedingungen (PBS) (Abb. 16). Nach 72 Stunden wurden sowohl in der PBS als auch in der ALP-Gruppe ($100\mu\text{g}$) reduzierte Werte (ca. 400cm/cm^2) im Vergleich zu den Mäusen, welche nach 6 und 24 Stunden untersucht wurden, beobachtet. Überraschend war die funktionelle Kapillardichte bei den Tieren nach hochdosierter ALP-Applikation ($300\mu\text{g}$) im Vergleich zu den PBS-behandelten Mäusen und den $100\mu\text{g}$ ALP-vorbehandelten Tieren signifikant vermindert. Die Reduktion wurde 6 Stunden sowie 24 Stunden nach Applikation beobachtet (Abb. 15).

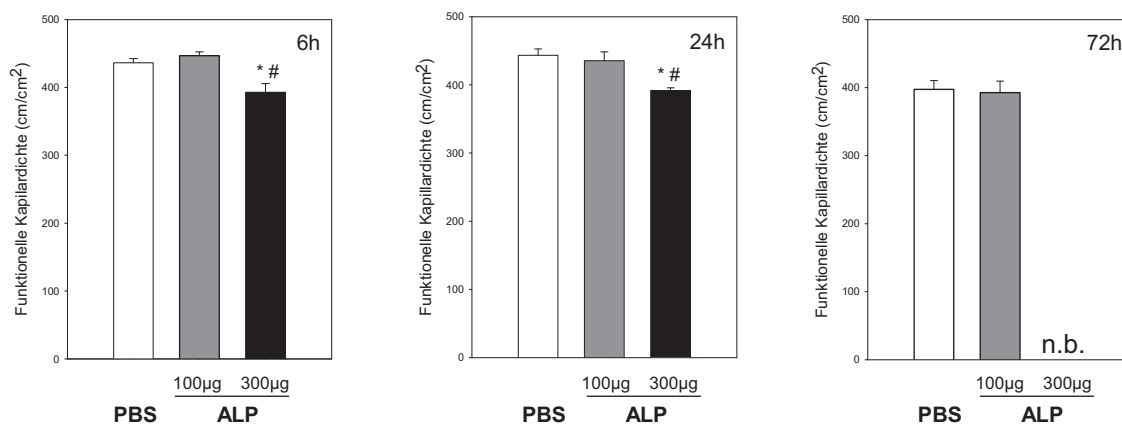


Abbildung 15: In vivo Effekt von ALP auf die synoviale Mikrozirkulation im Modell der CAIA der Maus. Funktionelle Kapillardichte (cm/cm^2) nach Anti-Kollagen II Antikörper-Exposition in DBA1/J Mäusen, welche zeitgleich mit PBS oder ALP in steigender Dosierung ($100\mu\text{g}$ oder $300\mu\text{g}$) behandelt wurden. Die Intravitalmikroskopie des Kniegelenkes erfolgte 6, 24 oder 72 Stunden nach Arthritisinduktion. Die Darstellung der Daten erfolgte als Mittelwerte und SEM bei $n=7$ Tieren pro Gruppe. * $p<0,05$ vs. PBS, # $p<0,05$ vs. ALP $100\mu\text{g}$, ANOVA, post hoc Vergleichstest. n. b., nicht bestimmt.

Blutzellfließgeschwindigkeit. Ohne ALP-Behandlung der Mäuse lag die Erythrozytenfließgeschwindigkeit in synovialen postkapillaren Venolen nach Induktion der CAIA zwischen $430\text{-}612\mu\text{m/sec}$. Diese Werte waren konform mit den Ergebnissen arthritischer Tiere aus dem Versuchsabschnitt I. Die Vorbehandlung der Mäuse mit $100\mu\text{g}$ ALP ergab im Vergleich zu

den PBS-behandelten Kontrolltieren keine signifikante Differenz. Hingegen wurde in den ALP-Hochdosisgruppen nach 6 und 24 Stunden eine deutliche Reduktion der Blutzellfließgeschwindigkeit beobachtet. Sowohl im Vergleich mit den PBS-behandelten Kontrolltieren als auch mit den 100µg ALP-vorbehandelten Mäusen wurde bei den Mäusen nach hochdosierter ALP-Gabe (300µg) eine signifikant reduzierte Erythrozytenfließgeschwindigkeit ermittelt (Abb. 16).

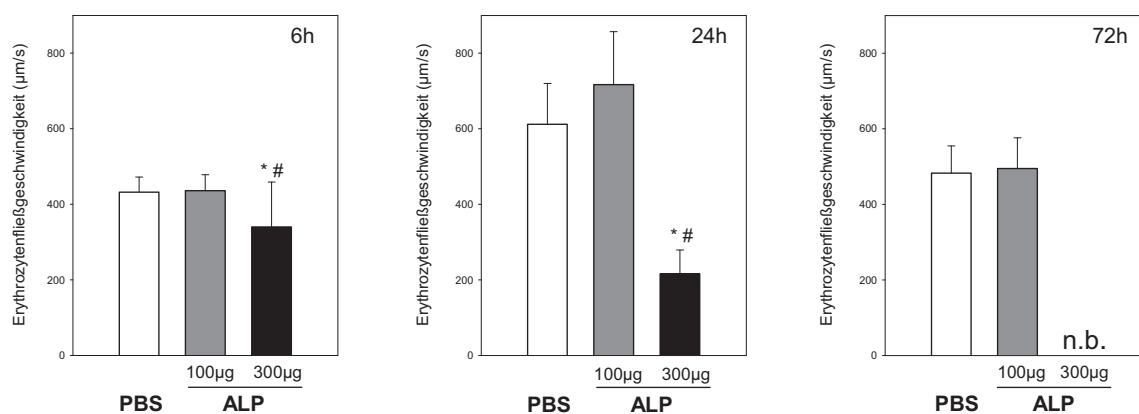


Abbildung 16: In vivo Effekt von ALP auf die synoviale Mikrozirkulation im Modell der CAIA der Maus. Venuläre Erythrozytengeschwindigkeit (V_{RBC} in $\mu\text{m}/\text{sec}$) in der synovialen Kniegelenksschleimhaut nach Anti-Kollagen II Antikörper-Exposition in DBA1/J Mäusen, welche zeitgleich mit PBS oder ALP in unterschiedlicher Dosierung (100µg oder 300µg) behandelt wurden. Die Intravitalmikroskopie des Kniegelenkes erfolgte 6, 24 oder 72 Stunden nach Arthritisinduktion. Die Darstellung der Daten erfolgte als Mittelwerte und SEM bei $n=7$ Tieren pro Gruppe. * $p<0,05$ vs. PBS, # $p<0,05$ vs. ALP 100µg, ANOVA, post hoc Vergleichstest. n. b., nicht bestimmt.

5.2.1.2. Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen in synovialen Venolen

Die leukozytäre Aktivierung infolge der Arthritisinduktion konnte durch die Therapie mit ALP deutlich inhibiert werden. Dies spiegelte eine reduzierte Endothelzell-Interaktion der Leukozyten wider. Die hemmende Wirkung von ALP bezog sich sowohl auf den Leukozytenflux als auch auf die rollenden und adhärenen Leukozyten. Da sich der inhibitorische Effekt von ALP bereits zu den Untersuchungszeitpunkten nach 6 und 24 Stunden deutlich abzeichnete, ohne signifikante Effizienzzunahme nach hochdosierter ALP-Vorbehandlung, verzichteten wir zum Untersuchungszeitpunkt nach 72 Stunden auf die 300µg ALP-Gruppe, die eine erneute ALP-Applikation nach 24 Stunden beinhaltet hätte. Die Darstellung der Leukozyten erfolgte mit Hilfe des Leukozytenmarkers Rhodamin 6G.

Leukozytenflux. Die Anzahl der passierenden Leukozyten war nach ALP-Gabe im Vergleich zu den PBS-behandelten Kontrolltieren zu allen Untersuchungszeitpunkten vermindert.

Während die Injektion von 100µg ALP nur eine minimale Reduktion des leukozytären Flux erzeugte, konnte nach Applikation von 300µg ALP eine signifikant reduzierte Anzahl an passierenden Leukozyten im Modell der CAIA beobachtet werden. Sowohl 6 als auch 24 Stunden nach ALP-Gabe zeigte sich in der ALP-Hochdosisgruppe eine statistisch signifikante Reduktion der frei fließenden Leukozyten im Vergleich zu den Tieren, welche mit PBS bzw. 100µg ALP vorbehandelt wurden (Abb. 17).

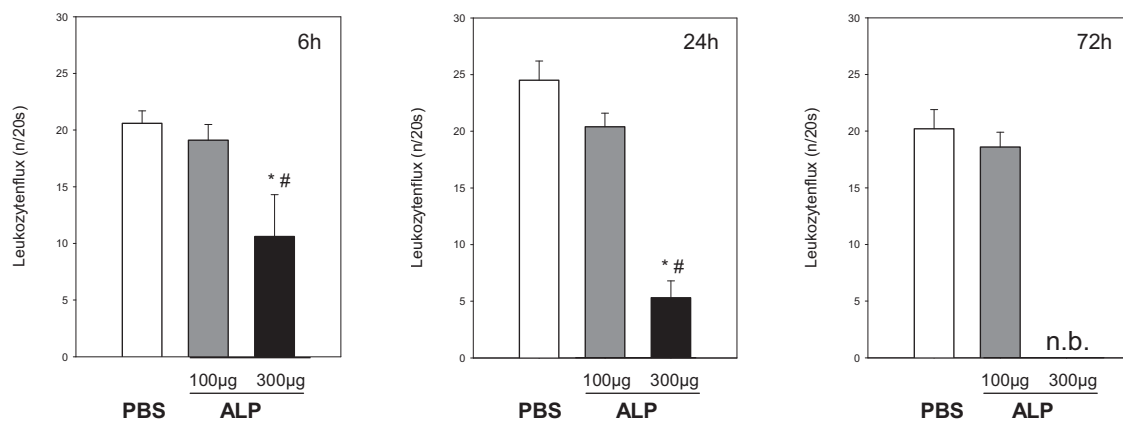


Abbildung 17: In vivo Effekt von ALP auf die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion im Modell der CAIA der Maus. Leukozytenflux (n/20sec) in den postkapillaren, synovialen Venolen nach Anti-Kollagen II Antikörper-Exposition in DBA1/J Mäusen, welche zeitgleich mit PBS oder ALP in unterschiedlicher Dosierung (100µg oder 300µg) behandelt wurden. Die Intravitalmikroskopie des Kniegelenkes erfolgte 6, 24 oder 72 Stunden nach Arthritisinduktion. Die Darstellung der Daten erfolgte als Mittelwerte und SEM bei n=7 Tieren pro Gruppe. *p<0,05 vs. PBS, # p<0,05 vs. ALP 100µg, ANOVA, post hoc Vergleichstest. n. b., nicht bestimmt.

Rollende Leukozyten. Der Anteil der *rollers* in Prozent aller passierenden Leukozyten lag nach Induktion der CAIA bei ca. 30%. Nach Applikation von ALP konnte in den arthritischen Tieren sowohl nach 6, 24 und 72 Stunden eine deutliche Reduktion der rollenden Leukozyten in den synovialen Venolen beobachtet werden (Abb. 18). Die Vorbehandlung der Mäuse mit 100µg ALP erzeugte im zeitlichen Verlauf eine kontinuierliche, signifikante Reduktion der *rollers* um ca. 30% im Vergleich zu den PBS-behandelten Kontrolltieren. In der ALP-Hochdosisgruppe (300µg) war zum frühen Untersuchungszeitpunkt nach 6 Stunden ebenfalls eine signifikante Reduktion der rollenden Leukozyten im Vergleich zu den Kontrollmäusen (PBS) zu verzeichnen. Dieser hemmende Effekt ließ sich allerdings nach 24 Stunden nicht mehr beobachten. Überraschend war die Fraktion der rollenden Leukozyten in der hochdosierten ALP-Gruppe nach 24 Stunden im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS) um 18% erhöht. Vergleichend mit den Tieren, welche mit 100µg ALP vorbehandelt wurden, bestand sogar eine signifikant erhöhte Anzahl der *rollers* in der 300µg ALP-Gruppe (Abb. 18).

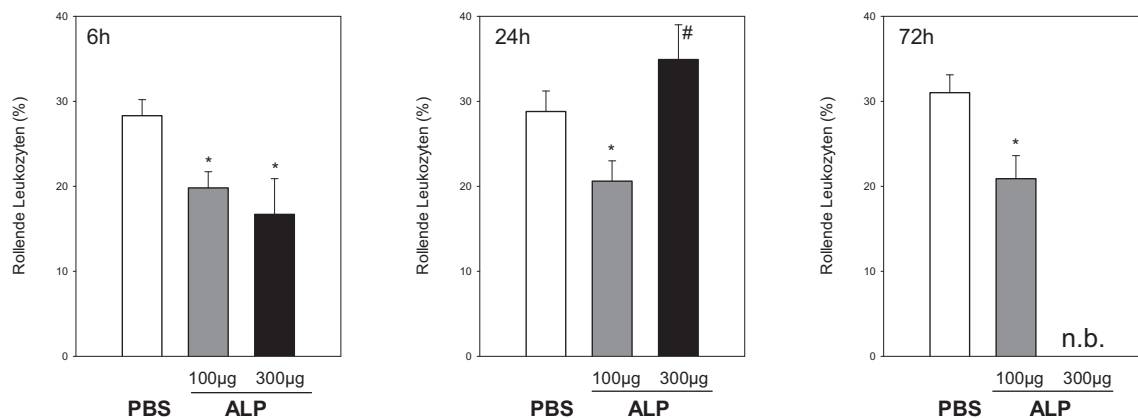


Abbildung 18: In vivo Effekt von ALP auf die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion im Modell der CAIA der Maus. Fraktion rollender Leukozyten (als Prozentsatz zu allen passierenden Leukozyten) am Endothel der postkapillaren, synovialen Venolen nach Anti-Kollagen II Antikörper-Exposition in DBA1/J Mäusen, welche zeitgleich mit PBS oder ALP in steigender Dosierung (100µg oder 300µg) behandelt wurden. Die Intravitalmikroskopie des Kniegelenkes erfolgte 6, 24 oder 72 Stunden nach Arthritisinduktion. Die Darstellung der Daten erfolgte als Mittelwerte und SEM bei n=7 Tieren pro Gruppe. *p<0,05 vs. PBS, # p<0,05 vs. ALP 100µg, ANOVA, post hoc Vergleichstest. n. b., nicht bestimmt.

Adhärente Leukozyten. Die intravitalmikroskopischen Bilder (Abb. 19) und die Diagramme (Abb. 20) zeigen den blockierenden Effekt von ALP auf die feste Adhäsion der Leukozyten mit dem Endothel synovialer Venolen nach Arthritisinduktion deutlich auf. Die Immunisierung der Mäuse mit monoklonalen Antikörpern führte zu einer inflammatorischen Zellantwort, die mit einer vermehrten Leukozytenadhäsion am Gefäßendothel einher ging (Versuchsabschnitt I, Abb. 13). Nach Arthritisinduktion lag die leukozytäre Adhärenz ohne ALP-Behandlung zwischen 928-1354 Zellen/mm² (Abb. 20). Durch die Therapie mit ALP konnte die Leukozytenadhärenz deutlich reduziert werden. Sowohl die Applikation von 100µg als auch von 300µg ALP erwies sich als effizient. Zu allen Untersuchungszeitpunkten führte die ALP-Behandlung der Mäuse im Vergleich zu den PBS-behandelten Tieren zu einer signifikanten Reduktion der leukozytären Adhärenz. 6 Stunden nach dem Antikörpertransfer konnte die Leukozytenadhärenz durch die gleichzeitige Therapie der Mäuse mit 100µg ALP um ca. 55% und nach Applikation von 300µg ALP sogar um 77% gesenkt werden. In der Intravitalmikroskopie zeigte sich 24 Stunden nach ALP-Gabe (100µg bzw. 300µg), vergleichend mit den Kontrollbedingungen (PBS), ebenfalls eine Reduktion der Leukozytenadhärenz um mehr als 50%. Zum späten Untersuchungszeitpunkt (72 Stunden) wurde die leukozytäre Adhärenz durch die ALP-Therapie im Vergleich zu den Kontrolltieren um 32% verringert.

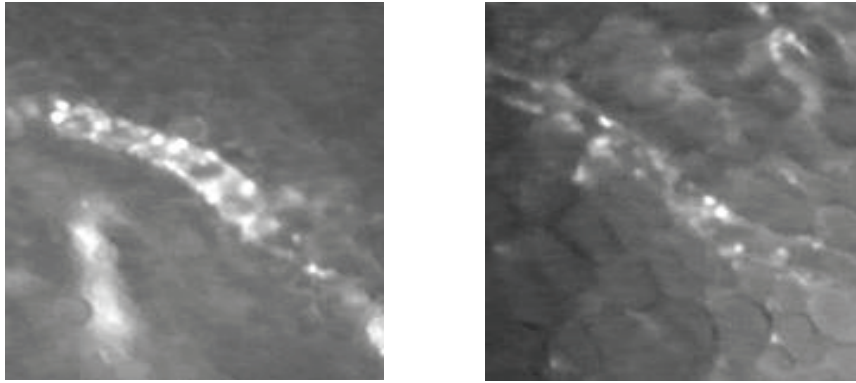


Abbildung 19: Repräsentative intravitalmikroskopische Aufnahmen adhärenter Leukozyten in postkapillaren Venolen nach Arthritisinduktion mit und ohne ALP-Behandlung (Vergrößerung x 376).

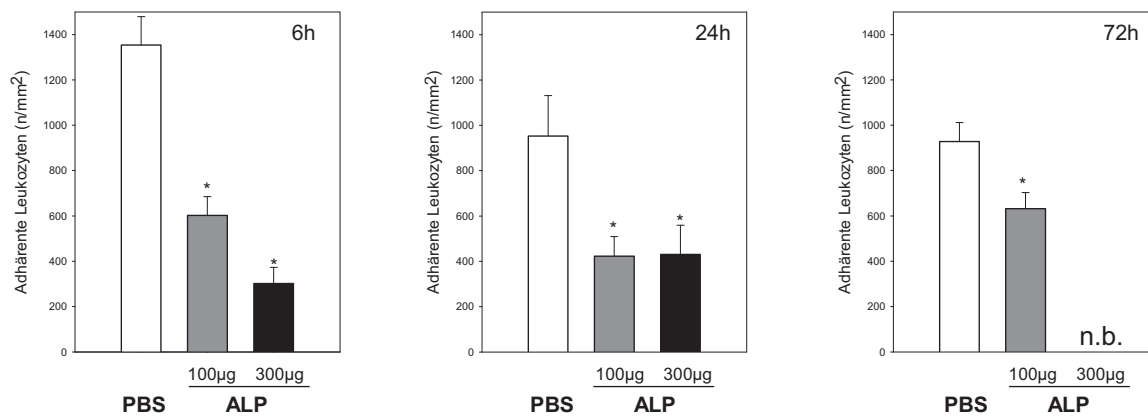


Abbildung 20: In vivo Effekt von ALP auf die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion im Modell der CAIA der Maus. Zahl der adhärenter Leukozyten (Zellen pro mm² endotheliale Oberfläche) am Endothel der postkapillaren, synovialen Venolen nach Anti-Kollagen II Antikörper-Exposition in DBA1/J Mäusen, welche zeitgleich mit PBS oder ALP in unterschiedlicher Dosierung (100µg oder 300µg) behandelt wurden. Die Intravitalmikroskopie des Kniegelenkes erfolgte 6, 24 oder 72 Stunden nach Arthritisinduktion. Die Darstellung der Daten erfolgte als Mittelwerte und SEM bei n=7 Tieren pro Gruppe. *p<0,05 vs. PBS, ANOVA, post hoc Vergleichstest. n. b., nicht bestimmt.

5.2.2. Klinischer Score

Die klinische Beurteilung des Gelenkstatus ergab, wie erwartet, aufgrund der geringen Zeitspanne von maximal 72 Stunden nach Arthritisinduktion keine signifikanten Unterschiede. Bei den Tieren, die nach 6 und 24 Stunden untersucht wurden, konnten unabhängig von der ALP-Behandlung keinerlei inflammatorischer Gelenkveränderungen im Sinne von Rötung und Schwellung beobachtet werden (<0,1). Zum späten Untersuchungszeitpunkt nach 72 Stunden zeigten sich bei den Kontrolltieren (PBS) vereinzelt Gelenkentzündungen, insbesondere der kleinen Vorfußgelenke. Im Vergleich dazu waren bei

den ALP-behandelten Mäusen nach 72 Stunden weniger Vorfußgelenke entzündlich verändert. Eine statistische Signifikanz ergab sich allerdings nicht. Inflammatorische Gelenkveränderungen der großen Gelenke, insbesondere der Knie- und Sprunggelenke, blieben aus (Tab. 4).

	6h	24h	72h
PBS	< 0,1	< 0,1	< 1,67
ALP 100µg	< 0,1	< 0,1	< 0,860
ALP 300µg	< 0,1	< 0,1	n.b.

Tabelle 4: Klinischer Score nach Nandakumar (0-60 Punkte, Nandakumar et al, 2003) nach Anti-Kollagen II Antikörper-Exposition in DBA1/J Mäusen, welche zeitgleich mit PBS oder ALP in unterschiedlicher Dosierung (100µg oder 300µg) behandelt wurden. Der Score wurde vor Durchführung der Intravitalmikroskopie des Kniegelenkes erhoben. Die Daten sind als Mittelwerte bei n=7 Tieren pro Gruppe dargestellt. n. b., nicht bestimmt.

5.2.3. Blutanalyse

Die nach Versuchsende angefertigten Blutbilder zeigten nach Arthritisinduktion und Therapiemodulation mit ALP bzw. PBS keine pathologischen Veränderungen oder Differenzen. Eine Leukozytose oder eine Beeinflussung der Subpopulationen im Sinne einer Lympho- oder Granulozytose (Ergebnisse nicht gezeigt) ließen sich nicht nachweisen (Tab. 5).

	6h			24h			72h		
	PBS	ALP 100µg	ALP 300µg	PBS	ALP 100µg	ALP 300µg	PBS	ALP 100µg	ALP 300µg
Hämoglobin (mmol/l)	7,6 ± 0,3	7,8 ± 0,2	7,9 ± 1,5	8,3 ± 0,2	9,2 ± 0,5	8,2 ± 0,3	10,5 ± 0,8	8,8 ± 0,3	n.b.
Hämatokrit (%)	47 ± 1	47 ± 1	49 ± 9	50 ± 1	56 ± 3	47 ± 2	66 ± 5	54 ± 2	n.b.
Thrombozyten (10 ⁹ /l)	730 ± 123	759 ± 139	140 ± 78	798 ± 141	663 ± 153	202 ± 124	702 ± 94	808 ± 72	n.b.
Leukozyten (10 ⁹ /l)	10,0 ± 0,9	8,7 ± 0,5	6,9 ± 4,0	6,0 ± 1,5	7,1 ± 1,2	6,4 ± 1,9	7,4 ± 0,8	8,2 ± 1,0	n.b.

Tabelle 5: Hämoglobin, Hämatokrit und Blutzellanalyse nach Anti-Kollagen II Antikörper-Exposition in DBA1/J Mäusen, welche zeitgleich mit PBS oder ALP in unterschiedlicher Dosierung (100µg oder 300µg) behandelt wurden. Die Blutentnahmen erfolgten nach Abschluß der Intravitalmikroskopie. Die Daten sind als Mittelwerte und SEM bei n=7 Tieren pro Gruppe dargestellt. n. b., nicht bestimmt.

5.2.4. Histologischer Score

Die histologischen Schnitte der Kniegelenke von DBA1/J Mäusen, beurteilt nach dem Score nach Brackertz (0-4 Punkte, Brackertz et al. 1977), waren einheitlich durch eine einschichtige Synovialis ohne Knorpel- und Knochenaffektionen (0-1 Punkt nach Brackertz, Ergebnisse nicht gezeigt) charakterisiert. Typische histologische Veränderungen im Sinne chronisch inflammatorischer Kniegelenksreaktionen, wie beispielsweise synoviale Hyperplasie bis zu Knorpel- und Gelenkdestruktionen, ließen sich durch die frühen Untersuchungszeitpunkte bis maximal 72 Stunden nach Arthritisinduktion unabhängig von der Therapie mit ALP nicht nachweisen (Abb. 21).

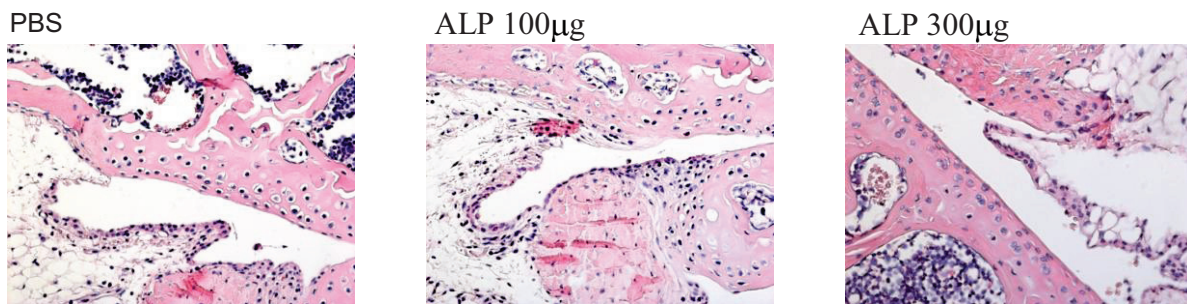


Abbildung 21: Repräsentative Kniegelenkshistologien 72 Stunden nach Anti-Kollagen II Antikörper-Exposition in DBA1/J Mäusen, welche zeitgleich mit PBS oder ALP in unterschiedlicher Dosierung (100µg oder 300µg) behandelt wurden (Vergrößerung x20).

5.3. Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden experimentellen *in vivo* Studie wurde im ersten Versuchsabschnitt in der frühen Phase zweier kinetisch unterschiedlicher Arthritismodelle der Maus die synoviale Mikrozirkulation am Kniegelenksmodell charakterisiert. Der zweite Versuchsabschnitt erfolgte zur Analyse der anti-inflammatorischen Wirksamkeit von ALP auf die Mikrozirkulation der Kniegelenksschleimhaut nach Arthritisinduktion. Die intravital-mikroskopisch erhobenen Daten der synovialen Mikrozirkulation wurden untermauert durch klinische und histologische Beurteilungen. Hierbei konnten folgende Ergebnisse erarbeitet werden:

1. Die Arthritisinduktion führte insgesamt zu geringen Einschränkungen der mikrovaskulären Perfusion. Die funktionelle Kapillardichte der Synovialschleimhaut war während der Initiationsphase weitestgehend konstant. Es bestand lediglich eine Tendenz zu reduzierten Werten nach Arthritisinduktion. Überraschend war die funktionelle Kapillardichte im Modell der CAIA vergleichend mit den Kontrolltieren erhöht. Bezüglich der Blutzellfließgeschwindigkeit wurde eine relevante Reduktion in den arthritischen Tieren beobachtet.
2. Trotz Abwesenheit klinisch, manifester Gelenkveränderungen aufgrund des frühen Untersuchungszeitpunktes nach Arthritisinduktion konnte innerhalb der synovialen Mikrozirkulation eine massive Entzündungsreaktion beobachtet werden. Die Arthritisinduktion führte zu einer deutlich gesteigerten Leukozyten-Endothelzell-Interaktion. Sowohl die Anzahl der *rollers* als auch der adhärenenten Leukozyten waren im Vergleich zu den Kontrollbedingungen signifikant erhöht.
3. In den zwei unterschiedlichen Arthritismodellen (CIA, CAIA) wurden in den empfänglichen Mausstämmen nahezu gleiche mikrozirkulatorische Veränderungen während der Initiationsphase beobachtet.
4. Die Applikation des Proteinaseinhibitors ALP führte zu einer deutlichen Reduktion der synovialen Entzündungsreaktion im Modell der CAIA. Der hemmende Einfluß von ALP auf die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion bezog sich gleichermaßen auf das Rolling

und die Adhärenz. Am effektivsten zeigte sich die Hemmung durch ALP sechs Stunden nach Applikation. Weiterhin war zum frühen Untersuchungszeitpunkt eine deutliche Abhängigkeit der leukozytären Hemmung von der ALP-Dosierung erkennbar. Zu späteren Zeitpunkten bewirkte die Dosissteigerung von ALP (300µg) keine weitere Hemmung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion im Vergleich zur Standarddosis von 100µg ALP.

5. Die hochdosierte ALP-Behandlung führte in arthritischen Tieren zu einer Reduktion der mikrovaskulären Perfusion der Synovialschleimhaut. Die funktionelle Kapillardichte, als Maß der nutritiven Perfusion, war nach Applikation von 300µg ALP im Vergleich zu den Kontrollbedingungen statistisch signifikant reduziert. Die Blutzellfließgeschwindigkeit wurde durch die Gabe von 300µg ALP ebenfalls reduziert.

6. Diskussion

6.1. Diskussion der Methoden

Die Begriffe *in vivo* und *in vitro* spielen heute in der medizinischen Forschung eine wichtige Rolle. *In vivo*, aus dem Lateinischen übersetzt mit „im Leben“, beschreibt eine wissenschaftliche Versuchsdurchführung am lebenden Objekt, während *in vitro* (lat.: im Glas) den Versuch im Reagenzglas bezeichnet. Während *in vitro* Ergebnisse nicht ohne weiteres auf die im Körper herrschenden physiologischen Verhältnisse übertragbar sind, stellen sich *in vivo* Untersuchungen weit aus komplexer und schwieriger dar, und erfordern häufig ein invasives Vorgehen.

Die medizinische Forschung ist auf experimentelle Untersuchungen zur RA angewiesen, um die Entschlüsselung der komplexen Mechanismen dieses Krankheitsbildes weiter voran zu treiben. Ziel ist es, daraus effiziente und nebenwirkungsärmere Strategien in der Therapie sowohl der akuten als auch chronischen Erkrankung abzuleiten. Aufgrund ethischer Fragestellungen und der schwierigen, eingeschränkten Darstellung der zu untersuchenden Gewebe, gepaart mit der heterogenen Manifestation der Erkrankung, ist der Rahmen für potentielle *in vivo* Untersuchungen an Patienten mit RA stark limitiert.

Somit werden *in vivo* Experimente seit Jahrzehnten in Form von Tierversuchen durchgeführt. Der Einsatz von Tiermodellen ist unumgänglich, um invasiv und mechanistisch Daten zu erheben, welche die bisher erworbenen Kenntnisse zur RA erweitern. Tiermodelle zur RA ermöglichen substantielle Einblicke in grundlegende pathogenetische Mechanismen der akuten und chronischen Arthritis und liefern darüber hinaus übergreifende Erkenntnisse zu Autoimmunerkrankungen.

Die RA ist eine heterogene Erkrankung, welche in verschiedene Subtypen klassifiziert wird. Die Subtypen werden durch unterschiedliche genetische Faktoren und Umwelteinflüsse geprägt. Daraus folgt, dass es nicht nur ein Modell geben kann, sondern verschiedene Modelle mit unterschiedlichen Phänotypen und pathogenetischen Grundlagen existieren. Während kein Modell ein perfektes Abbild der RA darstellt, ist entsprechend der Fragestellung ein geeignetes, etabliertes Modell auszuwählen. Etablierte Tiermodelle sind einfach reproduzierbar und durch vorangegangene Untersuchungen gut charakterisiert.

In unserer Studie wurden männliche Mäuse verschiedener Mausstämme (TCR, DBA1/J und FVB/NJ) verwendet. Die Maus hat sich in der medizinischen Forschung über Jahre hinweg bewährt und etabliert. Neben Vorteilen wie beispielsweise geringe Kosten, hohe

Verfügbarkeit und im Vergleich zu Großtieren einfache Haltung, ist die Maus durch zahlreiche vorausgegangene Untersuchungen ein immunologisch und genetisch gut charakterisiertes Tier (Blake JA et al. 2008; www.informatics.jax.org).

6.1.1. Kollagen-induzierte Arthritis

Unsere Ziel- und Fragestellung beinhaltete die Charakterisierung mikrozirkulatorischer Veränderungen in der frühen Phase nach Arthritisinduktion. Das Kniegelenksmodell der Maus ermöglicht mittels der Multifluoreszenzmikroskopie eine direkte online-Visualisierung der synovialen Mikrozirkulation und wurde bereits erfolgreich am Modell der AIA angewandt (Brackertz et al. 1977; Szanto et al. 2004). Die AIA ist ein etabliertes und vielfältig genutztes Arthritismodell. Ungleich zur RA, einer chronisch progressiven Erkrankung mit Beteiligung multipler Gelenke, repräsentiert die AIA eine akute, monoartikuläre Form der Arthritis, die sich am Kniegelenk nach einer intraartikulären Antigenapplikation manifestiert (Brackertz et al. 1977). Aufgrund der unterschiedlichen klinischen und pathognomischen Charakteristika im Vergleich zur humanen Erkrankung ergeben sich Bedenken zur klinischen Relevanz und Übertragbarkeit der AIA (Wooley 2004; Gál et al. 2005). Dies veranlasste uns, das Kniegelenksmodell in derzeit mehr genutzte und umfangreicher charakterisierte Tiermodelle der Maus zur RA zu transferieren.

Das Modell der CIA ist ein seit 25 Jahren intensiv studiertes Tiermodell, das sowohl immunologische, pathologische und genetische Merkmale mit der humanen RA teilt (Ho et al. 1986; Holmdahl et al. 1990). Das Modell ist in genetisch empfänglichen Mausstämmen reproduzierbar. Wie bei der RA ist die Empfänglichkeit eng mit der Expression von Klasse II MHC Allelen verknüpft (Wooley et al. 1981; Brunsberg et al. 1994).

Die CII-induzierte Polyarthritis zeichnet sich durch eine hohe Übereinstimmung mit dem klinischen und histologischen Krankheitsbild der RA aus (Trentham et al. 1982). Nach 5-6 Wochen entwickeln sich erste Schwellungen und Rötungen der kleinen Vorfußgelenke, gefolgt von den Hinterpfoten, mit progredienter Funktionseinschränkung bis hin zu Ankylosen und Deformationen. Inflammatorische Gelenkveränderungen dominieren in den distalen Sprung-, Tarsal- und Interphalangealgelenken. Diese Tatsache geht mit der RA konform, die ebenfalls bevorzugt die kleinen Hand- und Fußgelenke befällt, ist aber als Nachteil bezüglich unserer Untersuchungen am Kniegelenk zu werten. Mikrozirkulatorische Analysen von Gelenkveränderungen nach systemischer Antigenadministration sind auf andere

Gelenke übertragbar, wobei sich gegebenenfalls in klinisch betroffenen Gelenken die entzündlich bedingten Veränderungen der Mikrozirkulation noch prägnanter abzeichnen.

Die klinische Arthritis spiegelt sich histologisch durch charakteristische Synovialzellhyperplasie und inflammatorische Zellinfiltration gefolgt von Pannusbildung mit Knorpel- und Knochenzerstörung wider (Trentham et al. 1977). Allerdings fehlen vergleichend zur RA typische Ausbildungen von Lymphfollikeln und rheumatoiden Granulomen (Holmdahl et al. 1991; Herold 2004). Während die RA eine präferentielle Disposition des weiblichen Geschlechts zeigt, entwickeln bei der CIA männliche Mäuse deutlich häufiger Symptome als weibliche Tiere (Jirholt et al. 1998; Jansson und Holmdahl 1998).

Obwohl zahlreiche Studien auf die Erforschung der Pathogenese der CIA fokussierten, sind bis heute die komplexen Pathomechanismen nur wenig entschlüsselt. Hervorgehoben wird immer wieder die zentrale Rolle von T-Zellen, welche u. a. an T-Zell defizienten Mäusen und thymektomierten Ratten demonstriert wurde (Corthey et al. 1999; Klareskog et al. 1983). Die Bedeutung der T-Zellen liegt zum einen in der Produktion und Regulation von proinflammatorischen Zytokinen sowie in der Modulation der B-Zell-Antwort (Holmdahl et al. 1985a). Man unterscheidet zwischen $CD4^+$ T-Zellen als typische T-Helferzellen und $CD8^+$ T-Zellen, den klassischen zytotoxischen Zellen. Autoreaktive T-Helfer-Zellen, die gegen körpereigenes Gewebe gerichtet sind, erkennen Kollagen mittels zellständigem MHC II und stimulieren B-Zellen, Antikörper zu bilden. Die daraus resultierenden Immunkomplexe werden im Gewebe abgelagert, aktivieren das Komplementsystem sowie ortsständige Zellen und implifizieren somit den Entzündungsprozeß (Holmdahl et al. 1986). Entscheidend beeinflusst wird die T-Zellfunktion durch die Expression der α und β Oberflächenrezeptoren (TCR), welche verantwortlich für die Antigenbindung sind (Osman et al. 1998). Die Pathologie der CIA wird durch das komplexe Zusammenspiel von zellulären und humoralen Immunmechanismen bestimmt (Hom 1986; Seki et al. 1988; Holmdahl 1990). Neben der T-Zell-Reaktivität wurde die Bildung CII-spezifischer Antikörper bei der Progression der CIA gut dokumentiert. B-Zell-defiziente Mäuse sind trotz eines genetisch empfänglichen Hintergrundes gegenüber der CIA resistent (Svensson et al. 1998).

Zusammenfassend setzt die Immunisierung mit CII eine Entzündungskaskade mit T- und B-Zell-Aktivierung in Gang, gefolgt von einer Leukozytenmigration ins Gewebe. Die Zellinfiltration zusammen mit der komplexen Bildung von Zytokinen und anderen Mediatoren bedingen im Verlauf das klinische und histologische Bild der CIA (Feldmann 1996).

Bisherige Studien wurden zum großen Teil am Gipfel der Erkrankung, d.h. nach dem Auftreten klinisch manifester arthritischer Gelenkveränderungen erhoben. Die initialen Schritte der Arthritisentwicklung und im Besonderen die frühe Leukozyteninfiltration des Gewebes sind bisher nicht definiert. Aufgrund dessen fokussierten wir bewusst auf die Leukozytendiapedese zu einem frühen Zeitpunkt, d.h. vor dem Auftreten klinischer Symptome. Die erfolgreiche Umsetzung der Intravitalmikroskopie des Kniegelenkes im Modell der CIA ermöglicht anknüpfenden Studien die synoviale Mikrozirkulation weiter zu entschlüsseln. Interessant wäre u.a. eine Differenzierung der Leukozytensubpopulationen bei der frühen Gewebeeinfiltration. Bisher ist nicht bekannt, ob die initiale Leukozyteninfiltration durch Granulozyten geprägt ist oder vorrangig eine lymphozytäre Infiltration des Gewebes besteht. Des Weiteren können mit Hilfe der Intravitalmikroskopie die am Modell der CIA vielfach getesteten und entwickelten Immuntherapien mikrozirkulatorisch untersucht werden. Die Beeinflussung der Mikrozirkulation durch Anti-Zytokin-Therapien wie z.B. die Anti-TNF- α -oder Anti-TGF- β -Therapie (Kuruvilla et al. 1991; Brahn et al. 1992; Piguet et al. 1992; Cooper et al. 1992), aber auch neue Therapieansätze mit Anti-Adhäsionsmolekülen (Iigo et al. 1991; Jasin et al. 1992; Kakimoto et al. 1992) können einfach und direkt visualisiert und analysiert werden. Ergänzende mikrozirkulatorische Analysen tragen möglicherweise zur Optimierung der Therapien bei.

6.1.2. Anti-Kollagen Typ II Antikörper-induzierte Arthritis

Die CAIA ist ein relativ neues Tiermodell der RA, welches sich vor allem durch seinen akuten Verlauf auszeichnet. Nachdem die Bedeutung von IgG Antikörpern gegen CII in Patienten mit RA (Cook et al. 1996) und insbesondere bei der Pathogenese der CIA vielfach belegt wurde (Stuart et al. 1982; Stuart und Dixon 1983), zeigten darauf aufbauende Studien, dass sich durch den Transfer von monoklonalen Antikörpern eine Arthritis in gesunden Mäusen erzeugen lässt (Holmdahl et al. 1986). Es folgten weitere Untersuchungen mit dem Ergebnis, dass der Transfer einer Kombination aus zwei spezifischen CII Antikörpern, CIIC1 und M2.139, sich am effektivsten bei der Arthritisinduktion in Mäusen erwies (Terato et al. 1992, 1995; Johansson et al. 2001; Svensson et al. 2002; Burkhardt et al. 2002; Nandakumar und Holmdahl 2005). Dabei kann LPS als zweiter Immunstimulus verwendet werden, ist aber nicht essentiell für die Arthritisinduktion (Nandakumar et al. 2003b). Die Antikörper binden an spezifische konformationsabhängige Epitope des Kollagenmoleküls, welche

gleichermaßen in Mäusen, Ratten und Menschen exprimiert werden (Schulte et al. 1998; Kraetsch et al. 2001; Bajtner et al. 2005).

Für unsere Untersuchungen verwendeten wir einen Cocktail, bestehend aus den arthritogenen IgG Antikörpern CIIC1 und M2.139 in der Standarddosis von 4,5mg pro Antikörper. Aufgrund der höheren Inzidenz und stärkeren Arthritis im Vergleich zur i.p. Injektion wurde das Gemisch i.v. appliziert. Auf eine LPS-Substitution, die standardisiert am 5. Tag vorgesehen ist, wurde aufgrund unserer frühen Untersuchungszeitpunkte verzichtet.

Ca. 5 Tage nach dem Antikörpertransfer zeigen sich vor allem an den Vorfußgelenken erste entzündliche Gelenkveränderungen mit Schwellungen und Rötungen, die nach 8-10 Tagen maximal ausprägt sind. Die histologische Aufarbeitung arthritischer Gelenke ist durch eine massive Granulozyten- und Makrophageninfiltration, Fibrinablagerungen, Pannusformation und Knochenerosionen charakterisiert (Nandakumar und Holmdahl 2007).

Die Entwicklung der CAIA unterscheidet sich von der Pathogenese der CIA vor allem durch die Tatsache, dass die Induktionsphase der CIA, welche sich durch T-Zell-Aktivierung und Antikörperproduktion durch aktivierte B-Zellen auszeichnet, gewissermaßen übersprungen wird. Daraus ergibt sich die Annahme, dass die Entwicklung der CAIA unabhängig von MHC-assoziierten T- und B-Zellen verläuft. Unterstützend konnte gezeigt werden, dass T-Zell- und B-Zell-defiziente Mäuse für CAIA empfänglich sind. Interessanterweise ist die sich entwickelnde Arthritis stärker ausgeprägt als bei immunkompetenten Mäusen, so dass von einer modulatorischen Rolle dieser Zellen ausgegangen werden muß (Nandakumar et al. 2004). Des Weiteren bewirkte der Transfer von CII-reaktiven T-Zellen eine Prolongation der akuten Arthritis, aber keine chronische Verlaufsform im Modell der CAIA (Nandakumar et al. 2004; Mitamura et al. 2007). Man nimmt an, dass sich das regulatorische Potential der Lymphozyten im Besonderen bei der Initiation der Erkrankung auf die Modulation der Zytokinumgebung bezieht. Studien zeigten, dass IL-1 und TNF- α die wichtigsten Zytokine bei der Entwicklung der CAIA sind (Kagari und Shimozato 2002).

Im Vergleich zum klassischen Modell der CIA bietet die CAIA Vorteile durch den akuten Verlauf, die MHC-Haplotyp Unabhängigkeit und die hohe Reproduzierbarkeit. Das Bild der manifesten Arthritis der zwei Modelle weist viele gemeinsame Charakteristika auf. Ähnlich zur CIA steigt mit dem Alter der Mäuse die Empfänglichkeit für die CAIA. Des Weiteren finden sich Parallelen zur CIA bezüglich des Einflusses von Geschlecht und Hormonen. Weibliche Mäuse sind weniger empfänglich als männliche. Die reduzierte Arthritisinzidenz beim weiblichen Geschlecht wird u.a. durch Oestrogene vermittelt (Jansson et al. 1990; Nandakumar et al. 2003b; Nandakumar und Holmdahl 2007).

Das pathogene Potential von Antikörpern nach Bindung an der Knorpeloberfläche basiert vorrangig auf dem Fc-Fragment des Antikörpermoleküls, welches über Interaktionen mit Fc-Rezeptoren das Komplementsystem sowie die Zielzelle aktiviert. Fc-Rezeptoren sind Membranrezeptoren für verschiedene Immunglobuline und gehören zur Immunglobulin-Superfamilie. Fc γ -Rezeptoren binden die Fc-Domäne von IgG und werden in der Maus auf allen hämatopoetischen Stammzellen exprimiert. Eine Aktivierung von Zellen über Fc-Rezeptoren führt zu gesteigerter Phagozytose, der Produktion und Freisetzung von Zytokinen, der Endozytose opsonierter Antigene und der antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität. In der Maus und im Mensch existieren drei Strukturtypen des Fc γ -Rezeptors (Unkeless et al. 1988; Ravetch & Kinet 1991). Die Fc γ -Rezeptoren Fc γ RI und Fc γ RIII leiten aktivierende Signale in das Zellinnere weiter. Der Subtyp Fc γ RII ist dagegen ein inhibierender Rezeptor. FcR γ -defiziente Mäuse sind resistent gegenüber der CAIA. Sowohl im Modell der CIA als auch der CAIA wurde mehrfach gezeigt, dass Fc γ -Rezeptoren bei der Gelenkinflammation eine entscheidende Rolle einnehmen. So sind Mäuse mit einer Defizienz des Fc γ RIIb, welcher als negativer Regulator der Immunglobulinsynthese bekannt ist, hochsensibel gegenüber der CAIA (Nandakumar et al. 2003) und CIA (Kleinau et al. 2000). DBA/1 Mäuse, welche aufgrund genetischer Deletion keine aktivierenden Fc γ -Rezeptoren exprimieren, sind gegen die CIA trotz hoher Antikörpertiter gegen CII resistent (Kleinau et al. 2000).

Während Lymphozyten die Inflammation vermutlich regulatorisch beeinflussen, wird die akute Phase der CAIA durch die Gelenkinfiltration polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten und Makrophagen dominiert. Dies wird durch eine signifikante Reduktion der Inzidenz und Schwere der CAIA nach Antikörperblockade von neutrophilen Granulozyten unterstrichen (Nandakumar et al. 2003b). Aktivierung der Granulozyten und Makrophagen durch das Komplementsystem sowie durch Interaktion der Fc-Fragmente von CII-gebundenen Antikörpern mit den zellständigen Fc γ -Rezeptoren sind während des Entzündungsprozesses von großer Bedeutung. C3 und Faktor B-defiziente Mäuse entwickeln nach der Antikörperexposition lediglich eine milde Form der Arthritis, woraus zu folgern ist, dass die Komplementaktivierung sowohl über den klassischen als auch den alternativen Weg verläuft (Hietala et al. 2004). Man geht davon aus, dass nach der Antikörperimmunisierung die Aktivierung lokaler mononukleärer Zellen durch Immunkomplex-vermittelte Komplementfaktoren oder Fc γ R Querverknüpfungen eine vermehrte Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen im Gelenk und der näheren Umgebung bewirkt. Diese induziert wiederum eine chemotaxische Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen. Als initialer Schritt unterhält die Zellinfiltration weitere lokale

inflammatorische Prozesse, einschließlich der Mediatorausschüttung und Aktivierung ortsständiger Entzündungszellen (Nandakumar et al. 2003a; Hietala et al. 2004).

Zusammenfassend provoziert der Transfer von monoklonalen Antikörpern in nur kurzer Zeit eine akute, inflammatorische Gelenkentzündung. Das Modell der CAIA eignet sich zum Screening von Therapeutika, welche vor allem die inflammatorische Phase der Gelenkentzündung beeinflussen. Dabei ist das Modell keinesfalls auf die RA beschränkt, sondern bietet vielmehr eine Plattform zur Erforschung von Pathomechanismen in Antikörper-vermittelten Erkrankungen.

Nachdem wir die Intravitalmikroskopie des Kniegelenkes erfolgreich am Modell der CAIA anwenden konnten (Versuchsabschnitt I), nutzten wir das Modell im zweiten Schritt zur Analyse der Effektivität von ALP auf die initiale Phase der CAIA. Das Modell bietet sich nicht nur durch den Verlauf, sondern vor allem durch die von neutrophilen Granulozyten vermittelte Gelenkinflammation besonders an, die Effizienz von ALP, einem bekannten Immunmodulator und physiologischen Inhibitor neutrophiler Serinproteinasen, zu untersuchen.

6.1.3. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie und chirurgische Interventionen

Die Intravitalmikroskopie stellt mit ihren heutigen Möglichkeiten eine ideale Methode zur mikrozirkulatorischen Analyse dar (Menger et al. 1999). Mit Hilfe von fluoreszierenden Farbstoffen und hochauflösender Technologie können Vorgänge wie Apoptose, Flüssigkeitstransport, Plasmaextravasation, Endozytose und Diapedese beobachtet und untersucht werden (Dunn et al. 2002). Dabei handelt es sich um eine etablierte Technik, die bereits in verschiedenen Spezies und unterschiedlichen Organen, wie z.B. Gehirn (Villringer et al. 1989), Herz (Tillmanns et al. 1993; Vollmar et al. 1995), Lunge (Kuhnle et al. 1993), Leber (Vollmar et al. 1993, 1996), Darm (Bohlen und Gore 1976), Pankreas (Vollmar et al. 1994a), Mesenterium (Zweifach 1954 & 1973), Niere (Steinhausen et al. 1981) sowie Haut (Barker et al. 1989a & b) und Skelettmuskel (Nolte et al. 1994; Menger et al. 1992a & b) zur Analyse der Mikrozirkulation unter physiologischen und pathologischen Bedingungen angewandt wurde. Mittels Epi-Illumination und in vivo Fluoreszenzmikroskopie konnten gezielte Analysen zur Mikrozirkulation neue Informationen über Pathomechanismen von Entzündungsprozessen, Transplantatabstoßungen und Autoimmunprozessen, sowie deren medikamentöse Beeinflussung eruiert werden (Menger und Lehr 1993; Menger und Vollmar 1996).

Nach Etablierung der Intravitalmikroskopie im Kniegelenk der Maus durch Veihelmann und Mitarbeiter (Veihelmann et al. 1998) erfolgten erste erfolgreiche Anwendungen zur Charakterisierung der Mikrozirkulation nach einem Immunstimulus am Modell der Antigen-induzierten Arthritis (Veihelmann et al. 1999; Szanto et al. 2004). AIA repräsentiert eine akute, monoartikuläre Form der Arthritis, die durch eine intraartikuläre Antigenapplikation im Kniegelenk hervorgerufen wird (Brackertz et al. 1977). Ungleich zur AIA handelt es sich bei der RA um eine chronische, progressive Erkrankung mit Beteiligung multipler Gelenke. Im Gegensatz zur AIA sind die CIA und CAIA die derzeit mehr verwendeten und besser untersuchten Arthritismodelle. Beide Modelle sind charakterisiert durch systemische Autoimmunprozesse mit multipler Gelenkbeteiligung.

Der Aufbau des Kniegelenkes einer Maus, insbesondere des Hoffa-Fettkörpers mit der Synovialzellschicht, ist vergleichbar mit dem Kniegelenk des Menschen. Das Volumen des Hoffa-Fettkörpers der Maus beträgt $1\text{-}2\text{mm}^3$, wodurch eine optimale Sicht auf das synoviale Netzwerk erzielt werden kann. Bei der Ratte, die über ein 6-8 mal höheres Volumen des intraartikulären Fettkörpers verfügt, stellt sich die Sicht auf die Synovialzellschicht deutlich schwieriger und eingeschränkt dar. Die Kniegelenksschleimhaut der Maus kann durch ein einfaches, schnelles und unblutiges chirurgisches Procedere ohne Behinderung des intraartikulären Blutflusses exponiert werden.

Jede chirurgische Intervention kann zu einer Aktivierung inflammatorischer Prozesse mit einer Steigerung der Mediatorausschüttung, der Gefäßpermeabilität sowie der Leukozytenadhärenz führen (Kirveskari et al. 2003). Unsere Ergebnisse aus dem Versuchsabschnitt I mit konstant niedriger Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in den Kontrollgruppen (CFA- bzw. PBS-Applikation) zeigen auf, dass die chirurgische Manipulation einen nur geringen Einfluß auf die synoviale Mikrozirkulation nahm. Des Weiteren wurden alle Tiere mit der gleichen Sorgfalt und Präparationstechnik behandelt, was die Vergleichbarkeit sicher stellte.

Die chirurgische Präparation zur intravitalmikroskopischen Untersuchung der Synovialis macht eine Narkose, wie hier eine Ketamin/Xylazinanästhesie der Tiere unumgänglich. Der durch Ketamin induzierte Bewusstseinszustand wird als „dissoziative Anästhesie“ bezeichnet, d.h. gewisse Bereiche des Zentralnervensystems werden erregt, andere wiederum gehemmt. Das bewirkt einerseits den Verlust von Schmerzempfindung und Bewusstsein (Analgesie und Anästhesie), andererseits tritt, ausgelöst durch die erregenden Eigenschaften von Ketamin, eine motorische Starre (Katalepsie) ein. Die vitalen Funktionen zeigen sich weitgehend unbeeinflusst (Carroll & Hartsfield 1996; Plumb 2003). Neben einer geringen depressiven

Wirkung auf das Atemzentrum wird das Herz-Kreislaufsystem leichtgradig stimuliert. Schutzreflexe (Schluck-, Husten-, und Kornealreflex) bleiben während der Ketaminnarkose erhalten. Eine atemdepressive Wirkung bis hin zur Apnoe, begleitet von Hypoxämie und Hyperkapnie, wird oft beschrieben, ist jedoch nur in einem hohen Dosisbereich und vor allem bei i.v. Injektion von klinischer Relevanz (Carroll & Hartsfield 1996; Plumb 1999). Nachteilig sind anti-inflammatorische Wirkungen, die wahrscheinlich auf eine Blockade der neutrophilen Granulozyten zurückzuführen sind, zu werten (Zahler et al. 1999). Xylazin, ein α_2 -Rezeptorantagonist, erzeugt neben einer allgemeinen Muskelrelaxation einen schlafähnlichen (sedativ-hypnotischen) Zustand, der je nach Spezies unterschiedlich stark ausgeprägt sein kann. Da Aufregung und Nervosität die Wirkung von Xylazin beeinträchtigen, wurden die Mäuse bis zum vollen Wirkungseintritt nicht durch Lärm oder Berührung gestört. Xylazinnarkosen können in Tieren Bradykardien (Wright 1982) mit AV-Blöcken 2. Grades (Alef & Oechtering 2003), Reduktion des Herzzeitminutenvolumens (Muir et al. 1979) und verminderte Ventrikelkontraktionen (Benson & Thurmon 1990) auslösen.

Zur Kontrastverstärkung während der Mikroskopie verwendeten wir die Fluoreszenzmarker FITC-Dextran und Rhodamin 6G. Vorteile des Plasmamarkers FITC-Dextran sind eine gute Wasserlöslichkeit, geringe Präzipitation und geringe Hintergrundfluoreszenz (Tuls et al. 1989). Ein Aspekt, der die Darstellung des Intravasalraumes unter Verwendung von FITC-Dextran einschränkt, ist die Phototoxizität (Rumbaut et al. 1999). Um die Lichtexposition möglichst gering zu halten, wurde während der Versuche darauf geachtet, dass die freigelegte Synovialis nur während der gezielten Videomikroskopie einer Lichteinstrahlung ausgesetzt wurde. Die Extravasation und die begrenzte Fluoreszenzaktivität können aufgrund unserer Versuchsdauer von unter 60 Minuten vernachlässigt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde die intravitale Fluoreszenzmikroskopie genutzt, weil sie eine ideale Technik zur Analyse der Mikrohämodynamik der Kniegelenkschleimhaut darstellt. Während andere Verfahren zur Beurteilung der Mikrozirkulation, wie beispielsweise die Mikrosphären-Technik (Zwissler et al. 1991), die Partialdruckmessung des Gewebesauerstoffs (Conzen et al. 1988; Vollmar et al. 1992), die Thermographie (Saumet et al. 1986), die Laser-Doppler-Flowmetrie (Vollmar et al. 1994b; Chavez-Cartaya et al. 1995), Farbstofftechniken (McKeeb Olds & Stafford 1930; Elias & Petty 1953) oder Techniken zum Anfertigen von Mikrokorrosionspräparaten (Forsman & McCormack 1992) allesamt nur indirekte Aussagen zur Mikrozirkulation zulassen, ist die in vivo Fluoreszenzmikroskopie in Kombination mit der Epi-Illuminationstechnik durch direkte Visualisierung des Gefäßsystems den genannten Techniken überlegen. Funk und Mitarbeiter beschrieben ein in vivo Modell im

Kaninchen zur Analyse der synovialen Vaskularisation mittels Mikroendoskopie (Funk et al. 1995), das in ähnlicher Form auch an Patienten mit RA angewandt wurde (Hempfling 1996). Allerdings ist die Technik auf hämodynamische Parameter (z.B. Blutzellfließgeschwindigkeit) und morphologische Aspekte der Gefäße limitiert. In vivo Beobachtung von Leukozyten und deren Interaktionen mit dem Endothel sind vor allem in Hinblick auf die Entwicklung neuer Therapieansätze entscheidend. Diesbezüglich wurden zahlreiche in vitro (Muller 1995) und in vivo Modelle (Granger & Kubes 1994) beispielsweise im Gehirn (Villringer et al. 1989) und Mesenterium (Wakelin et al. 1996) entwickelt. Die in vivo Fluoreszenzmikroskopie des Kniegelenkes bietet eine einfach anzuwendende ideale Untersuchungstechnik zur mikrozirkulatorischen Erfassung von zum einen mikrohämodynamischen Parametern und zum anderen der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion. Die Kombination der Intravitalmikroskopie des Kniegelenkes mit der CIA und der CAIA eignet sich hervorragend, um bisherige Erkenntnisse zu den Arthritismodellen auszubauen und neue Aspekte zur Pathogenese aufzuzeigen.

6.2. Diskussion der Ergebnisse

6.2.1. Rolle der Mikrozirkulation in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis

Inflammatorische Gelenkprozesse sind ein Hauptmerkmal der RA. Charakteristisch ist eine hohe Zellinfiltration, die von Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten dominiert wird. Die Aktivierung zirkulierender Leukozyten, ihre Interaktion mit dem Endothel gefolgt von der transendothelialen Migration und Infiltration des Gewebes sind die ersten entscheidenden Schritte einer komplexen Sequenz Mediator-vermittelter Prozesse bei der Gelenkinflammation. Weitere Entzündungsprozesse, einschließlich Synovialzellhyperplasie und aggressive Pannusbildung, führen zu einem Integritätsverlust des Knorpels und letztendlich zum völligen Funktionsverlust des Gelenkes.

Entzündliche Gelenkveränderungen beeinflussen die synoviale Mikrozirkulation und sind gleichzeitig das Ergebnis mikrozirkulatorischer Veränderungen (Gearing & Newman 1993). Die Intravitalmikroskopie stellt ein geeignetes Werkzeug dar, Störungen und Veränderungen innerhalb der synovialen Mikrozirkulation quantitativ zu erfassen. Im Kniegelenk sowie im Sprunggelenk der Maus konnten bereits erfolgreich Störungen der Mikrozirkulation nach Arthritisinduktion dokumentiert werden. Am Modell der AIA wurden sowohl mikrohämodynamische Parameter als auch die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in der akuten, intermediären und chronischen Phase analysiert (Veihelmann et al. 1999; Schmitt-Sody et al. 2007a & b). Des Weiteren wurde die Kinetik mikrozirkulatorischer Veränderungen in der Proteoglykan-induzierten Arthritis erfasst (Gál et al. 2005).

Unsere intravitalmikroskopischen Untersuchungen zeigten eine signifikante Differenz der venulären Leukozyteninteraktion zwischen den Arthritis empfänglichen Mausstämmen, unabhängig von der Art der Arthritisinduktion, im Vergleich zu den Kontrollmäusen. Nach Etablierung des Kniegelenkmodells durch Veihelmann (Veihelmann et al. 1998) konnte die synoviale Mikrozirkulation erstmals am Modell der CIA und CAIA charakterisiert werden. Im Gegensatz zu den bisherigen Studien, die am Gipfel der Erkrankung durchgeführt wurden, fokussierten wir nach Arthritisinduktion bewusst auf das initiale, von klinischen Symptomen freie Stadium. Sowohl die TCR als auch die DBA1/J Maus zeigten nach Arthritisinduktion mikrozirkulatorische Veränderungen der Hämodynamik begleitet von einer gesteigerten zellulären Immunantwort. Beide Mausstämme eignen sich für weitere intravital-mikroskopische Analysen hinsichtlich der Leukozytendiapedese, Pathogenese oder Therapiemodulation in den von uns verwendeten Arthritismodellen.

Um die nutritive Versorgung und Produktion der Synovialflüssigkeit zu gewährleisten, besitzt das Synovium ein dichtes kapillares Netzwerk. Entsprechend zeigte unsere intravitalmikroskopische Auswertung in allen untersuchten Mausstämmen unabhängig von der Arthritisinduktion eine sehr hohe Kapillardichte mit Werten von durchschnittlich 330cm/cm². In Balb/c Mäusen wurde in vorausgegangenen Studien eine funktionelle Kapillardichte mit Werten um 220cm/cm² ermittelt. Vom jetzigen Standpunkt ist die erhöhte funktionelle Kapillardichte in den von uns verwendeten DBA1/J, TCR und FVB/NJ Mäusen -im Vergleich zur Balb/c Maus- am ehesten auf Stammunterschiede zurück zu führen (Veihelmann et al. 1999).

Im DBA1/J Mausstamm war die Kapillardichte nach der Anti-CII Antikörper-Exposition im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant erhöht. Gezählt wurden nur Kapillaren, welche in die Oxygenation und Nutrition des Gewebes involviert, d.h perfundiert waren. Die Erhöhung der funktionellen Kapillardichte nach Arthritisinduktion resultiert möglicherweise aus der Rekrutierung nicht perfundierter Kapillaren, im Zuge der beginnenden Inflammation und damit verbundenen Hyperperfusion. Eine andere Erklärung, die allerdings aufgrund der geringen Zeitspanne zwischen Arthritisinduktion und experimenteller Beobachtung wenig wahrscheinlich scheint, ist die Neoangiogenese. Angiogenese spielt bekanntermaßen bei chronischen Entzündungen und Tumorwachstum eine entscheidende Rolle (Jackson et al. 1997). Bei der RA und in Arthritismodellen wurden aber auch in frühen Stadien signifikante Steigerungen der funktionellen Kapillardichte beobachtet. Untersuchungen zeigten, dass die Neoangiogenese dabei wahrscheinlich der Hauptmechanismus ist (Koch et al. 1995; Tak et al. 1995; Stogard et al. 1999; Veihelmann et al. 1999). Diese Assoziation basiert auf der Grundlage, dass Migration und inflammatorische Zellinfiltration, Prozesse die bei der Initiation einer Arthritis entscheidend mitwirken, mit einer vermehrten Produktion von TNF- α , IL-1 und NO verbunden sind, welche indirekte und direkte Angiogeneseaktivität besitzen (Jackson et al. 1997). Unterstützt wird die Hypothese durch Studien, welche eine vermehrte Expression der Adhäsionsmoleküle E-Selektin und VCAM-1 detektierten. E-Selektin und VCAM-1 sind ebenfalls als Angiogenesevermittler in frühen Arthritisphasen bekannt (Tak et al. 1995; Koch et al. 1995). Ob sich diese Hypothese bestätigt oder noch weitere bisher nicht bekannte Mechanismen bei der frühen Zunahme der funktionellen Kapillardichte nach Arthritisinduktion eine Rolle spielen, bleibt durch weitere Untersuchungen zu klären.

Im Gegensatz dazu wurde im Modell der CIA eine reduzierte funktionelle Kapillardichte im Vergleich zu den gesunden Kontrollmäusen dokumentiert. Die Reduktion perfundierter

Kapillaren nach CII-Arthritisinduktion ist am ehesten durch einen erhöhten Gelenkinnendruck zu erklären. Man vermutet, in Anlehnung an Ischämie-Reperfusions-Modelle, dass eine Ödembildung eine Kompression der Kapillaren bewirkt (Harris et al. 1997). Die Ödembildung ist dabei an die Leukozyteninfiltration gekoppelt. In den Modellen wurde beschrieben, dass die Leukozytenadhäsion für den Verlust der Barrierefunktion des Endothels und damit verbundener Extravasation mitverantwortlich ist (Adams & Shaw 1993; Cowley et al. 1994). Die leukozytäre Adhärenz leitet die transendotheliale Emigration in das perivaskuläre Gewebe ein und bewirkt eine Triggerung leukozytärer Aktivierungsreaktionen (Hernandez et al. 1987). Durch die Ausschüttung zytotoxischer Degranulationsprodukte wird die physiologische endotheliale Barrierefunktion zerstört. Damit können Flüssigkeit und Makromoleküle ins Interstitium bzw. ins Gelenk eindringen, wodurch sich der interstitielle bzw. Gelenkinnendruck erhöht. Um die genaue Beeinflussung der funktionellen Kapillardichte in frühen Arthritisstadien zu charakterisieren, sind weitere Untersuchungen essentiell.

Für die Ernährung des Gelenkknorpels ist die Effizienz des Sauerstoffaustausches zwischen synovialen Kapillaren und der Gelenkhöhle entscheidend von der funktionellen Kapillardichte sowie der Blutzellfließgeschwindigkeit abhängig. Um der nutritiven Funktion gerecht zu werden, ist die synoviale Blutzellfließgeschwindigkeit im Vergleich zu postkapillaren Venolen der quergestreiften Muskulatur oder der dorsalen Haut doppelt so hoch (Veihelmann et al. 1998; Steinbauer et al. 1997; Lehr et al. 1993). Unsere Analysen zeigten in allen arthritischen Tieren, unabhängig vom Arthritismodell, eine Reduktion der Blutzellfließgeschwindigkeit im Vergleich zu den Kontrolltieren. Wie bei der funktionellen Kapillardichte besteht die Vermutung, dass die reduzierte Blutzellfließgeschwindigkeit auf einem erhöhten Gelenkinnendruck basiert. Der erhöhte Gelenkinnendruck sowie die vermehrte venuläre Leukozytenadhärenz nach Arthritisinduktion bewirken eine Zunahme des Strömungswiderstandes, woraus eine Reduktion der erythrozytären Fließgeschwindigkeit resultiert (Hardy et al. 1996). Unsere Ergebnisse gehen mit den bisherigen intravitalmikroskopisch erhobenen Daten zur Blutzellfließgeschwindigkeit in arthritischen Gelenken konform (Veihelmann et al. 1999).

Trotz der Abwesenheit klinischer Zeichen einer Arthritis zeigte sich intravitalmikroskopisch in der frühen Phase nach Arthritisinduktion sowohl im Modell der CIA als auch der CAIA eine deutliche zelluläre Immunantwort. Gesteigertes Leukozytenrolling sowie eine vermehrte Leukozyten-Endothelzell-Adhärenz im venösen Stromgebiet sind Indikatoren für ein aktiviertes Immunsystem. Dass die Immunantwort nicht auf die chirurgische Präparation des

Kniegelenkes zurück zu führen ist, zeigte die durchweg niedrige Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in gesunden Kontrolltieren. Auch die Tatsache, dass sich bei den FVB/NJ Mäusen, einem Mausstamm, der als nicht empfänglich gegenüber einer Arthritis beschrieben wird, nur sehr wenige Interaktionen zwischen Leukozyten und dem Endothel nach Arthritisinduktion nachweisen ließen, spricht gegen eine relevante Aktivierung der Zellen durch die chirurgische Manipulation.

Trotz der symptomfreien präarthritischen Phase konnten wir nach Arthritisinduktion in den suszeptiblen Mausstämmen einen erhöhten synovialen Leukozytenflux sowie eine signifikante Zunahme der Interaktion von Leukozyten mit dem Gefäßendothel intravitalmikroskopisch beobachten. Es wurde beschrieben, dass die Höhe des zirkulierenden Leukozytenpools die Zahl der rollenden Leukozyten beeinflusst (Kim und Sarelius 2004). Ein Einfluß auf die feste Leukozytenadhärenz wurde bisher nicht gezeigt. Diese wird vorrangig durch ein aktiviertes Endothel vermittelt.

Sowohl das Rolling als auch die feste Leukozytenadhäsion war in unseren Untersuchungen nach der Antikörper- bzw. Kollagenexposition im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich gesteigert. Der Prozentsatz der rollenden Leukozyten betrug in der initialen Phase der CIA im Mittel 50%. Im Bezug zur Studie von Veihelmann et al. ist die Anzahl der *rollers* vergleichbar mit der akuten Phase der AIA (Veihelmann et al. 1999). Veihelmann et al. erzeugten durch eine intraartikuläre Albumininjektion eine Inflammation des Kniegelenkes. Die intravitalmikroskopischen Untersuchungen erfolgten in der akuten, intermediären und chronischen Phase der AIA. Vergleichend mit unseren intravitalmikroskopischen Daten im Modell der CIA und der CAIA ergibt sich eine deutliche Diskrepanz bezüglich der festen Leukozytenadhäsion. Während im Modell der AIA in der akuten Phase eine Leukozytenadhäsion von durchschnittlich 437 Zellen/mm² ermittelt wurde, zeigte sich in unserer Studie nach Arthritisinduktion eine leukozytäre Adhärenz von 800-1000 Zellen/mm². Somit ist die feste Adhäsion der Leukozyten am Endothel in der präarthritischen Phase der CIA und CAIA doppelt so hoch wie in der akuten Phase der AIA (Veihelmann et al. 1999). Dabei ist zu klären, ob diese Diskrepanz darauf zurück zu führen ist, dass unterschiedliche Arthritismodelle verwendet wurden, oder ob die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in der initialen präklinischen Phase stärker als in der akuten Phase ausgeprägt ist. Die von uns erhobenen Daten unterstützen die zweite Hypothese. Im Modell der CAIA war die Anzahl der adhärennten Leukozyten in der präarthritischen Phase am höchsten. Im weiteren Verlauf bis zum Auftreten erster Gelenkschwellungen und -rötungen nach 72 Stunden nahm die venuläre Leukozytenadhärenz stetig ab. Weiterhin wurde im Modell der AIA die höchste Frequenz der

rollenden und adhärenenten Leukozyten in der Akutphase beobachtet. Der Übergang in die chronische Phase zeigte ebenfalls einen stetigen Rückgang der Leukozyteninteraktion mit dem Endothel. Die Kombination unserer Daten mit der genannten Studie deutet darauf hin, dass die mikrovaskuläre Leukozytenadhärenz, gefolgt von der leukozytären Gelenkinfiltration bereits vor den ersten klinischen Zeichen ihren Höhepunkt erreicht und dann langsam mit Übergang in eine Plateauphase abklingt. Diese Überlegung unterstreicht die Auffassung, dass eine therapeutische anti-inflammatorische Intervention so früh wie möglich begonnen werden sollte.

Die gesteigerte Leukozyten-Endothelzell-Interaktion ist Resultat einer Aktivierung der Leukozyten und des Endothels und somit nicht losgelöst von aktivierenden Zytokinen und Adhäsionsmolekülen zu betrachten. Während die chronische Arthritis durch Gene dominiert wird, welche überwiegend in Zellteilung und -proliferation involviert sind (Ibrahim et al. 2002), scheint das frühe Krankheitsstadium durch eine deutliche Hochregulation von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen charakterisiert zu sein. Die Rekrutierung von Leukozyten im entzündeten Gewebe ist eine präzise Abfolge von Interaktionen zwischen zirkulierenden Leukozyten und Endothelzellen. Dabei wird jede sequentielle Interaktion durch spezifische Gruppen an Adhäsionsmolekülen vermittelt. Die Selektine sind entscheidend am Leukozytenrolling beteiligt, gefolgt von leukozytären Integrinen, welche durch Bindung an ihre endothelialen Gegenrezeptoren (z.B. VCAM, ICAM) die Adhäsion der Leukozyten ermöglichen (Springer 1994; Muller 2002). Bisherige Studien deckten auf, dass insbesondere die endothelialen Adhäsionsmoleküle E-Selektin und P-Selektin entscheidenden Einfluß auf die Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten haben (Kunkel & Ley 1996; Kunkel et al. 2000, Issekutz et al. 2001). P-Selektin wird auf Thrombozyten und Endothelzellen exprimiert und kann innerhalb von Sekunden nach Stimulation z.B. durch Thrombin aus den α -Granula mobilisiert werden (Stenberg et al. 1995; Gawaz 2001). Bei Patienten mit akuter Arthritis wurden erhöhte P-Selektin Serumkonzentrationen veröffentlicht (Ertenli et al. 1998; Veale et al. 1998; De Benedetti et al. 2000). Weiterhin konnte in Tierversuchen intravitalmikroskopisch gezeigt werden, dass P-Selektine in der akuten Phase der AIA durch vermehrte Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion das Rollen von neutrophilen Granulozyten auf aktivierten Thrombozyten vermitteln. Dadurch wird im Verlauf auch die feste Endotheladhäsion der Granulozyten begünstigt (Schmitt-Sody et al. 2007a & b). Die transienten Interaktionen der Selektine mit ihren leukozytären Liganden führen zu einer schwachen Bindung der Leukozyten an die Gefäßwand mit dem Resultat einer verminderten Fließgeschwindigkeit (Kunkel & Ley 1996). Dies ermöglicht den proinflammatorischen

Zytokinen, welche auf dem Endothel präsentiert werden, durch Interaktionen mit entsprechenden Rezeptoren der Leukozytenmembran, die Aktivierung der β 2-Integrine. Im Vordergrund steht die Aktivierung der Integrine LFA-1 (CD11a/CD18) und Mac-1 (CD11b/CD18) (Mizgerd et al. 1997). Die daraus folgende β 2-Integrin-abhängige Interaktion der Leukozyten mit endothelialen Liganden, wie z.B. ICAM-1 oder PECAM-1, stabilisiert das Rolling und provoziert den Arrest sowie die feste Adhäsion der Leukozyten als Voraussetzung für die finale Migration durch die Gefäßwand (Shang & Issekutz 1999; Thompson et al. 2001). Dieser enge kausale Zusammenhang zwischen Rolling und Adhärenz der Leukozyten wird weiterhin durch die Beobachtung gestützt, dass die Inhibition des Rollens auch zu einer Reduktion der Adhärenz führt (Kubes & Kerfoot 2001).

Die komplexen Zusammenhänge zwischen Adhäsionsmolekülen und ihren Interaktionspartnern sowie die genaue Beeinflussung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion vor allem in der frühen Arthritisphase sind noch weitestgehend unklar. Begleitende Genanalysen durch unsere Arbeitsgruppe zeigten, dass während der frühen Arthritisentwicklung bevorzugt Gene, welche Adhäsionsmoleküle, Zytokine und Chemokine kodieren, prädominant in Mäusen mit CIA exprimiert werden (Gierer et al. 2005). Diese Ergebnisse stimmen mit den bisherigen Erkenntnissen überein, dass der Schlüsselmechanismus der Synovitis neben der inflammatorischen Zellaktivierung und -adhäsion die Produktion von Mediatoren, wie z.B. Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren umfasst (Szekanecz & Koch 2001; Bingham 2002). Vielfach wurde in vivo und in vitro die Bedeutung der Zytokine TNF- α und IL-1 belegt. Diese Zytokine regulieren u.a. NF κ B-induzierbare Gene, welche ihrerseits Adhäsionsmoleküle, proinflammatorische Mediatoren und immunmodulierende Moleküle mitwirkend kontrollieren. Hohe Konzentrationen an TNF- α und IL-1 fördern wiederum die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion (Luscinskas et al. 1995; Hickey et al. 1997).

Aufgrund dieser kausalen Zusammenhänge erfolgte die Entwicklung von Anti-Zytokin-Strategien mit anschließender Evaluation in umfassenden klinischen Studien (Feldmann et al. 2004). Die Anti-TNF- α -Therapie konnte bereits erfolgreich an Patienten mit RA angewandt werden. Hierbei zeigte sich eine verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen verbunden mit einer Abnahme der Zelldichte des rheumatischen Synovialgewebes (Tak et al. 1996; Paleolog et al. 1996). Daraus ergibt sich die Hypothese, dass anti-inflammatorische Effekte von der Supprimierung Zytokin-induzierter vaskulärer Adhäsionsmoleküle abhängig sind und eine reduzierte Zellmigration ins Gewebe zur Folge haben. Weitere therapeutische Ansatzpunkte durch direkte Hemmung der Adhäsionsmoleküle erbrachten den gewünschten

Erfolg zwar in Tiermodellen, aber nicht im Menschen. Anti-E-Selektin-Antikörper führten im Tiermodell zu einer klinischen Verbesserung, begleitet von einer verminderten Akkumulation von Granulozyten und Monozyten im entzündeten Gelenk (Issekutz et al. 2001). Ähnliche Studien in verschiedenen Arthritismodellen konnten mittels Antikörperblockade von VCAM-1, ICAM-1, VLA-4 oder L-Selektin die Arthritisentwicklung positiv beeinflussen. Dies war vermutlich durch eine verminderte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten bedingt (Bullard et al. 1996; Carter et al. 2002; Issekutz et al. 2003). Dabei ist hervorzuheben, dass lediglich die frühen Phasen der Arthritisentwicklung in Ratten und Mäusen positiv durch Antikörper, die gegen Adhäsionsmoleküle gerichtet waren, beeinflusst werden konnten. Antikörpertherapien am Gipfel der Erkrankung erzielten jedoch keinen Benefit (Szanto et al. 2004). Im Synovialgewebe von Patienten mit RA wurden ebenfalls eine erhöhte Zellinfiltration und eine gesteigerte Expression von E-Selektin, ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1, VLA-4 und MAC-1 immunhistochemisch nachgewiesen (Tak et al. 1995, Johnson et al. 1993). Trotz der vielversprechenden Ergebnisse aus Tiermodellen konnten die Therapien mit Anti-Adhäsionsmolekülen bisher nicht erfolgreich am Menschen angewandt werden.

Möglicherweise stellt eine Kombination aus Anti-Adhäsionsmolekül- und Anti-Zytokin-Therapie den Schlüssel des Erfolges dar. Die bisherigen Ergebnisse gehen aber mit unseren Daten konform, dass die gesteigerte Leukozyten-Endothelzell-Interaktion ein integraler Bestandteil nicht nur der Manifestation und des Fortschreitens der Arthritis, sondern vielmehr der Initiation der Erkrankung ist, und dass therapeutische Interventionen so früh wie möglich hierbei eingreifen sollten.

6.2.2 Effektivität von Antileukoproteinase in der Behandlung der rheumatoiden Arthritis

Der schädigende Effekt durch die Aktivierung und Einwanderung von Leukozyten, insbesondere der polymorphkernigen Neutrophilen, konnte bei der RA bereits gezeigt werden (Schulze-Koops et al. 1998; Taylor et al. 2000). Entsprechend konnte durch Hemmung der Leukozyten die Ausprägung der arthritischen Veränderungen reduziert werden (Davis & Johnston 1986; Thomas & Carroll 1993; Schulze-Koops et al. 1998). Dies legt nahe, dass zwischen der Einwanderung und Akkumulation von Leukozyten und dem entstehenden Gewebeschaden ein kausaler Zusammenhang liegt.

Unsere Untersuchungen am Modell der CAIA zeigen deutlich auf, dass die präventive Verabreichung von ALP, als einmalige Dosis von 100µg pro Maus, eine signifikante

Suppression der Leukozytenrekrutierung bewirkt. Der blockierende Effekt von ALP auf die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion bezog sich sowohl auf das initiale Rolling als auch auf die nachfolgende Phase der festen Adhärenz. Während eine vorausgegangene Studie bereits klinisch ein therapeutisches Benefit von ALP nach dem Transfer von Anti-CII Antikörpern in Mäusen zeigten (Sehnert et al. 2004), konnten unsere intravitalmikroskopischen Daten diese Beobachtungen stützen. Sehnert und Mitarbeiter beschrieben am Modell der CAIA eine Reduktion von Schwere und Inzidenz der Arthritis, sowie einen protektiven Einfluß auf Knorpel- und Knochendestruktion nach Vorbehandlung der Mäuse mit ALP (Sehnert et al. 2004). Weiterhin wurden u.a. im Modell der Streptokokken-Zellwand-induzierten Arthritis (Song et al. 1999) und in Ischämie/Reperusionsmodellen der Leber inhibitorische Effekte von ALP auf die Leukozytengewebeinfiltration nachgewiesen (Lentsch et al. 1999; Eipel et al. 2007). Das von uns verwendete Modell der CAIA kennzeichnet sich durch eine akute Immunkomplex-vermittelte, neutrophilen-abhängige Gelenkinflammation aus. In Kombination mit der Intravitalmikroskopie konnte das inhibitorische Potential von ALP auf die Leukozytenrekrutierung visualisiert werden.

Unsere Ergebnisse gehen einher mit dem bisher veröffentlichten Wirkungsprofil von ALP, das sich im Besonderen auf die Selektin- und Integrin-abhängige Interaktion der Leukozyten mit dem aktivierten synovialen Endothel bezieht. Das Rolling wird als Selektin-abhängige Interaktion der Leukozyten mit dem mikrovaskulären Endothel definiert (Jung & Ley 1999). Die Selektin Oberflächenexpression auf Leukozyten und dem Endothel wird primär über die transkriptionale Aktivierung reguliert. Die Regulation erfolgt dabei durch NF- κ B (Bevilacqua et al. 1989). Stimuli wie z. B. das Zytokin IL-1 β können über die NF- κ B Signalkaskade die Expression von E-Selektin auf Endothelzellen rapide steigern (Read et al. 1995; Collins et al. 1995). Die ALP-vermittelte Hemmung des Rollings steht im engen Zusammenhang mit der Zytokinsignalkaskade in endothelialen Zellen (Collins et al. 1995). ALP reduziert die IL-1 β -bedingte Hochregulation von E-Selektin, was durchflußzytometrisch durch Sehnert et al. gezeigt wurde. Diese Beobachtung lässt sich wahrscheinlich durch die ALP-vermittelte Suppression der IL-1 β -induzierten NF- κ B Aktivierung erklären (Sehnert et al. 2006).

Neben der Reduktion des Leukozytenrollings zeigten unsere in vivo Untersuchungen im Modell der CAIA eine blockierende Wirkung von ALP auf die feste Adhäsion. Das regulatorische Potential und die Inhibition der in vivo Leukozytenadhäsion durch ALP ist eng verknüpft mit der β 2-Integrinaktivierung. Die β 2-Subfamilie wird nur auf Leukozyten exprimiert und ist maßgeblich an der Festigung der leukozytären Interaktion mit dem Endothel beteiligt. Auf ruhenden Leukozyten sind β 2-Integrine, im besonderen MAC-1 und

LFA-1, nur schwach exprimiert. Nach Stimulation werden die in zytoplasmatischen Granula gespeicherten Glykoproteine rasch auf der Zelloberfläche exponiert und können u.a. mit ICAM-1 auf Endothelzellen interagieren (Lentsch & Ward 2000). Die Funktion der Integrine unterliegt einem raschen Wechsel zwischen dem inaktiven und dem aktiven Zustand der Moleküle. Die Aktivierung von Integrinen führt zu Affinitätsänderungen. Modellvorstellungen anhand von elektronenmikroskopischen Bildern beschreiben eine scherenförmige Bewegung der transmembranären α und β -Untereinheit beim Übergang in den aktiven Zustand (Humphries et al. 2003). Bestimmte Stimuli z.B. Zytokine oder Antikörper induzieren über spezifische Aktivierungsepitope eine aktive Konformation des Integrins (van Kooyk & Figdor 1993; Liddington & Ginsberg 2002). ALP supprimiert in stimulierten Granulozyten die $\beta 2$ Ketten-Konformationsänderung von LFA-1 und MAC-1 in den aktiven Zustand. Die Hemmung der Konformationsänderung resultiert aus einer Suppression der Zytoskelettorganisation in Granulozyten. Die dadurch verminderte Oberflächenexpression aktivierter $\beta 2$ -Integrine reduziert die Interaktion der Leukozyten mit endothelialen Adhäsionsmolekülen (ICAM, VCAM). Das Resultat ist eine verminderte Adhäsion von Leukozyten am aktivierten Endothel (Butcher 1991; Springer 1994; Mitzgerd et al. 1997).

ALP zeichnet sich durch ein komplexes inhibitorisches Spektrum mit Beeinflussung sowohl des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems aus. Die genauen Funktionen und Interaktionspartner von ALP konnten bisher nur zum Teil aufgedeckt werden. Im Mittelpunkt vieler in vivo und in vitro Untersuchungen steht derzeit die Beeinflussung der NF- κ B Signalkaskade durch ALP (Taggart et al. 2002; Song et al. 1999). NF- κ B ist ein aus Dimeren bestehender Transkriptionsfaktor, der nach Translokation in den Zellkern die Expression zahlreicher Gene, u.a. von Chemo- und Zytokinen, Adhäsionsmolekülen und Enzymen reguliert (Perkins 2007). Im inaktiven Zustand liegt NF- κ B zytosolisch an das inhibitorische Protein I κ B gebunden vor, welches bei einem entsprechenden Signal durch das Proteasom 26S abgebaut wird. In der aktivierten, freien Form transloziert NF- κ B in den Nukleolus und übt durch Bindung an Promotoren regulatorischen Einfluß auf die Transkription spezifischer Gene aus, bevor ein inkompletter Rücktransport von NF- κ B ins Zytoplasma erfolgt (Tapalaga et al. 2002). Bei Säugern existieren drei inhibitorische Proteine (I κ Bs), das I κ B α , I κ B β und I κ B ϵ , sowie ein I κ B-ähnliches Protein, das Bcl-3 genannt wird. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B kann durch unterschiedliche Signalwege aktiviert werden. Der am meisten beobachtete klassische NF- κ B-Signalweg wird durch Stimuli wie TNF- α , IL-1 β und LPS, gefolgt von einer schnellen Phosphorylierung von I κ B α bzw. I κ B β ausgelöst (Tapalaga et al. 2002). In der Streptokokken-Zellwand-induzierten Arthritis der Ratte, welche durch eine Neutrophilen-

vermittelte akute Phase und eine T-Zell abhängige chronische destruktive Phase der Arthritis charakterisiert ist, reduzierte die Gabe von ALP die Schwere der Erkrankung auf klinischer, histologischer und molekularer Ebene. Dabei wurde neben der Reduktion des proteolytischen Gewebeschadens durch die Neutralisation der Elastase im Besonderen die Suppression der NF- κ B-abhängigen proinflammatorischen Entzündungskaskade hervorgehoben (Song et al. 1999). Hierbei wurde u. a. eine Inhibition der TNF- α Produktion beschrieben. Man vermutet, dass ALP die zytoplasmatische Degradierung des NF- κ B Inhibitors I κ B β beeinflusst (Taggart et al 2002). Weitere Studien zeigten ergänzend, dass die Mortalität nach einem LPS-induzierten Schock in Mäusen, die einen ALP Mangel aufwiesen, deutlich erhöht war. Außerdem wurde in ALP-defizienten Makrophagen eine erhöhte Interleukin-6 und NF- κ B Aktivität dokumentiert (Nakamura et al. 2003). In Bezug auf die Leukozytenrekrutierung wurde die ALP-assoziierte Reduktion der IL-1 β -induzierten NF- κ B-Aktivierung vielfach hervorgehoben. Die Suppression dieses Signalweges führt u.a. zu einer verminderten Expression von E-Selektinen auf Endothelzellen (Bevilacqua et al. 1989; Read et al 1995; Collins et al. 1995). Es ist wahrscheinlich, dass die reduzierte Expression von E-Selektin Einfluß auf das Rolling der Leukozyten hat. Insgesamt muß man von einem breiten Spektrum anti-inflammatorischer Effekte durch die Hemmung der IL-1 β -induzierten NF- κ B-Aktivierung durch ALP ausgehen, da dieser Signalweg für die Hochregulation zahlreicher Adhäsionsmoleküle und inflammatorischer Mediatoren verantwortlich ist (Xia und Gosh 2005).

Basierend auf der Blockade der nukleären Translokation von NF- κ B und daraus resultierender Reduktion der TNF- α -Freisetzung wurde die anti-apoptotische und anti-inflammatorische Wirkung von ALP an einem murinen Modell zum akuten Leberversagen getestet (Eipel et al. 2007). Vergleichbar zu den hier vorliegenden Daten führte die Applikation von ALP zu einer signifikanten Reduktion der venulären Leukozytenadhärenz in der Leber. Des Weiteren wurde eine signifikante Reduktion der Transaminasen als Zeichen des eingeschränkten nekrotischen Leberschadens beobachtet. Unter der Therapie mit ALP wurde eine verminderte Anzahl NF- κ B-p65-positiver hepatozellulärer Kerne sowie eine signifikante Reduktion der Plasmakonzentrationen von TNF- α und Il-10 nachgewiesen. Allerdings konnte die massive hepatozelluläre Apoptose und die damit verbundene Sterblichkeit nur unwesentlich beeinflusst werden. Diese Tatsache unterstützt die Annahme, dass die Suppression der NF- κ B Funktion nicht zwangsläufig mit einem Benefit für den Organismus einhergehen muß. Konkordant dazu erbrachte die Inhibition von NF- κ B am Modell der Staphylokokken-induzierten Arthritis keinen Vorteil in Hinblick auf Mortalität und Schwere der Erkrankung

(Gjertsson et al. 2001). Da NF- κ B eine essentielle Komponente vielfältiger Abwehrmechanismen insbesondere gegen exogene Noxen übernimmt, kann eine Suppression von NF- κ B den Organismus auch negativ oder schädigend beeinflussen (Sha et al. 1995; Gjertsson et al. 2001). Man geht davon aus, dass z.B. nach Exposition eines bakteriellen Stimulus die Hochregulation von NF- κ B-abhängigen Chemokinen zur gezielten Bakterienabwehr notwendig ist (Lavon et al. 2000). Weiterhin erzeugt die verminderte Transkription von anti-inflammatorischen Zytokinen in ALP-behandelten Tieren eine Reduktion der IL-10 Plasmakonzentration (Eipel et al. 2007). IL-10 zeichnet sich als negativer Regulator von proinflammatorischen Genen aus, wodurch die Immunantwort inhibiert wird (DiPiro 1997; Hamilton et al. 2002; Oberholzer et al. 2002). Daraus resultiert, dass die auch von uns gezeigte ALP-assoziierte Inhibition der initialen Inflammation, welche vermutlich durch die Hemmung der NF- κ B Signalkaskade vermittelt wird, nicht mit einem besseren Outcome der Mäuse einhergehen muß. Möglicherweise erweist sich die NF- κ B-Hemmung sogar als Nachteil im weiteren Krankheitsverlauf. Der initialen NF- κ B Aktivierung in Leukozyten, die mit einer vermehrten Expression proinflammatorischer Gene assoziiert ist, folgt später eine vermehrte Expression anti-inflammatorischer Gene (Lawrence et al. 2001).

Diese Aspekte könnten eine mögliche Erklärung liefern, dass sich in unserer Studie der hemmende Effekt von ALP zu den frühen Untersuchungszeitpunkten deutlich abzeichnete und bereits nach 72 Stunden abnahm. Das inhibitorische Potential von ALP ist allerdings nicht nur durch die Interaktion mit der NF- κ B Signalkaskade zu erklären. Vielmehr handelt es sich nur um eine Komponente der komplexen ALP-Interaktionen. Um auch nach 72 Stunden eine gleich bleibende oder sogar zunehmende inhibitorische Wirkung auf die mikrovaskuläre Leukozytenadhärenz zu beobachten, sind ggf. wiederholte Gaben von ALP nötig. Eine Dosissteigerung zeigte zumindest nicht den gewünschten Erfolg.

Die ALP-vermittelte Reduktion der Leukozytenextravasation wird neben der Hemmung der Zytokin-abhängigen Endothelzellaktivierung durch Interaktion mit der NF- κ B Signalkaskade auf die Inhibition der β_2 -Integrinaktivierung zurück geführt. Zelloberflächenmoleküle der β_2 Integrinfamilie, im besonderen LFA-1 (CD11a/CD18) und Mac-1 (CD11b/CD18), sind während des Entzündungsprozesses für viele Leukozytenfunktionen wie z.B. Adhäsion, Extravasation und Phagozytose von großer Bedeutung (Hogg et al. 2002). Adhäsive Fähigkeiten der Integrine auf neutrophilen Granulozyten werden durch ein "inside-out" Signaltransfer über Interaktion der zytosolischen Integrinuntereinheit mit dem Zytoskelett reguliert. In diesen Prozess, der letztendlich in einer Leukozytenaktivierung mit Ausbildung von Rezeptor-Klustern und einer Affinitätszunahme mündet, wurde L-Plastin (Lpl) als

zytosolischer Ligand identifiziert (Sehnert et al. 2004). Lpl ist ein Actin-bindendes Protein, welches aus einer Kopfreion und zwei Actin-bindenden Domänen besteht (Lin et al. 1988). Die genaue Funktion von Lpl bei der Mikrofilamentverknüpfung ist noch unklar. Die Bindung von Immunkomplexen an Fc-Rezeptoren (FcR) neutrophiler Granulozyten verursacht eine Reorganisation des Actin-Zytoskeletts, wodurch verschiedene Prozesse einschließlich Degranulation und Sekretion inflammatorischer Zytokine, oxidative Verbrennung und Phagozytose reguliert werden. Des Weiteren werden durch Interaktion mit Zytoskelett-assoziierten Molekülen verschiedene Signaltransduktionskaskaden beeinflusst (Lowell & Berton 1999). In diesem Zusammenhang wird der inhibitorische Effekt von ALP auf FcR-stimulierte neutrophile Granulozyten diskutiert. Die Interaktion von ALP mit dem Actin-bindenden Protein Lpl supprimiert die stimulations-induzierte Verknüpfung von F-Actin. Man vermutet, dass eine direkte Interaktion zwischen ALP und der funktionellen Domäne von Lpl erfolgt (Jones et al. 1998). Dadurch wird die Konformationsänderung des Zytoskeletts in den aktivierten Zustand blockiert, wodurch wiederum die Aktivierung der β_2 -Integrine effizient gehemmt wird. Nach einem inflammatorischen Stimulus wird durch ALP sowohl der Konformationswechsel der ruhenden Zelloberflächenmoleküle in die aktive Form als auch die Hochregulation der Membranexpression durch Mobilisation aus zytoplasmatischen Granula deutlich gehemmt. Insbesondere werden die β_2 -Integrine LFA-1 (CD11a/CD18) und Mac-1 (CD11b/CD18), welche maßgeblich an der Geweberekrutierung von Leukozyten beteiligt sind, weniger auf der Leukozytenoberfläche exprimiert (Butcher 1991; Springer 1994; Mizgerd et al. 1997).

Im Serum von Patienten mit RA wurde seit 1968 vielfach eine erhöhte ALP-Aktivität beschrieben (Frank & Klemmayer 1968; Beyeler et al. 1995; Spooner et al. 1982; Kendall et al. 1970; Siede et al. 1989; Cimmino et al. 1990). Im Jahr 2002 wurde bekannt, dass auch die Synovialflüssigkeit erhöhte ALP-Konzentrationen aufweist (Nanke et al. 2002). Ebenfalls konnte eine positive Korrelation zwischen erhöhten ALP-Spiegeln im Serum und der Krankheitsaktivität, gemessen an der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit und dem CRP-Anstieg, gezeigt werden (Nanke et al. 1989; Cimmino et al. 1990; Akesson et al. 1980). Die klinische Relevanz von ALP bleibt aber weiterhin offen. Im Menschen wurden verschiedene ALP-Subtypen z.B. vom Knochen- oder Lebertyp definiert. Knochentyp-ALP, welches unter anderem von Osteoblasten aber auch von Synovialgewebe sezerniert wird, reflektiert die Formation von Knochen und ossäre Umbauprozesse. Dieser ALP-Subtyp ist aber bei Patienten mit RA nicht immer erhöht (Nanke et al. 2002, 2003).

Widersprüchlich zeigten Versuche am Modell der AIA in der Ratte, dass ALP nach systemischen Transfer spezifisch im gesunden Gelenkknorpel und nicht im arthritischen Knorpel akkumuliert (Burkhardt et al. 1997). In der Knorpelmatrix übernimmt ALP durch das breite inhibitorische Spektrum, im Besonderen durch Hemmung der Serinproteinasen, eine wichtige Schutzfunktion (Okada & Nakanishi 1989; Okada et al. 1988). Die hohe Affinität des Inhibitor-moleküls für die Knorpelmatrix eröffnet eventuell Möglichkeiten der therapeutischen Intervention und Prävention zur Erhaltung der Knorpelintegrität in frühen Stadien chronischer Gelenkentzündungen. Weiterhin kann die Anreicherung des Proteinaseinhibitors im Gelenkknorpel diagnostisch zur Darstellung von Knorpelalterationen genutzt werden (Budinger & Taylor 1995). Diese Option wurde bereits in der ALP-Scintigraphie am Kniegelenk der Ratte umgesetzt (Meyer et al. 2000). Das Potential der ALP-Scintigraphie, Knorpelschäden mit einer hohen Sensitivität früh zu erfassen, ermöglicht das zeitige therapeutische Eingreifen, mit dem Ziel der Prävention irreversibler Gelenkschäden, und ist von großem Interesse bei der nichtinvasiven Diagnostik und dem qualitativen Monitoring von therapeutischen Effekten.

Zahlreiche Studien zu ALP entschlüsselten bis zum jetzigen Zeitpunkt vielzählige Funktionen des physiologischen Inhibitor-moleküls, wobei detaillierte Zusammenhänge im Besonderen zum genauen molekularen Wirkmechanismus sowie zur genetischen Beeinflussung und den Interaktionspartnern noch ausstehen. Die bis dato propagierten anti-inflammatorischen und anti-proteolytischen, aber auch anti-mikrobiellen und anti-apoptotischen Fähigkeiten von ALP lassen das Ausmaß der möglichen Therapieoptionen erahnen. Ein therapeutisches Benefit sowie eine klinische Effizienz wurden tierexperimentell und im Menschen bei verschiedenen Lungenerkrankungen, wie dem Lungenemphysem und der zystischen Fibrose, demonstriert (Kramps et al. 1988, 1991a, 1991b; McElvaney et al. 1992).

Unsere Studie konnte erstmals mittels der in vivo Fluoreszenzmikroskopie den inhibitorischen Einfluß von ALP auf die Interaktion der Leukozyten mit dem Gefäßwandendothel in einem akuten Modell zur RA in der Maus nachweisen. Neben dem bereits beschriebenen klinischen Vorteil durch ALP-Vorbehandlung der Mäuse im Modell der CAIA (Sehnert et al. 2004) konnte ergänzend intravitalmikroskopisch eine deutliche Reduktion der Selektin-abhängigen und Integrin-abhängigen mikrovaskulären Leukozytenadhärenz in der Initiationsphase der Arthritis demonstriert werden. Die Beteiligung von ALP an Immunkomplex-induzierten inflammatorischen Signalkaskaden basiert u.a. auf der FcR-induzierten Reorganisation des Actin-Zytoskeletts mit dem Resultat einer Modulation der β_2 -Integrinfunktion. Neben der Beeinflussung der β_2 -Integrine auf Leukozyten wird die modulatorische Rolle von ALP auf

die Zell-Zell-Adhäsion durch die Interaktion mit der NF- κ B Signalkaskade vermittelt. Dadurch wird unter anderem die Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle reduziert. Ob sich der protektive Effekt von ALP auf die Leukozytenrekrutierung vorrangig in der Initiationsphase der CAIA oder auch in der Akutphase und im chronischen Verlauf nachweisen lässt, ist derzeit noch unklar. Möglicherweise steht in fortgeschrittenen Stadien die anti-proteolytische Fähigkeit des Inhibitor-moleküls im Vordergrund, wobei die Hemmung der Leukozytenextravasation nur noch einen kleinen Stellenwert bei der Protektion der Gelenkinflammation einnimmt.

Um die Bedeutung und den Nutzen von ALP weiter verifizieren zu können, sind ergänzende Untersuchungen zur Kinetik, Dosierung und Identifikation von Interaktionspartnern nötig. Die von uns erhobenen Daten zu ALP stehen im Einklang mit den bereits beschriebenen inhibitorischen Fähigkeiten des Immunmodulators und deuten auf ein vielversprechendes therapeutisches Potential bezüglich Leukozytenrekrutierung und endothelialer Barrierefunktion hin. Die Inhibition der mikrovaskulären Leukozytenadhärenz könnte für die Reduktion der Leukozyteninfiltration sowie Chemokinfreisetzung und damit für die Reduktion des konsekutiven Gewebeschadens von wichtiger, therapeutischer Bedeutung sein. Es ist durchaus denkbar, dass sich der Krankheitsverlauf bei der RA durch das breite inhibitorische Wirkprofil von ALP positiv beeinflussen lässt. Inwieweit sich diese Ergebnisse auch auf die RA beim Menschen übertragen lassen und dies für zukünftige Therapiestrategien von Bedeutung ist, müssen weitere Studien zeigen.

7. Quellen und Literaturangaben

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. **Cellular and molecular immunology.** W. B. Saunders Company, USA 1997;250-77
2. Adams DH, Shaw S. **Leukocyte-endothelial interactions and regulation of leucocyte migration.** Lancet 1993;343:831-6
3. Ahmed-Choudhury J, Russell CL, Randhawa S, Young LS, Adams DH, Afford SC. **Differential induction of nuclear factor-kappaB and activator protein-1 activity after CD40 ligation is associated with primary human hepatocyte apoptosis or intrahepatic endothelial cell proliferation.** Mol Biol Cell 2003;14:1334-45
4. Akesson A, Berglund K, Karlsson M. **Liver function in some common rheumatic disorders.** Scand J Rheumatol 1980;9:81-8
5. Albelda SM und Buck CA. **Integrins and other cell adhesion molecules.** FASEB J 1990;4:2868-80
6. Alef M und Oechtering G. **Krankheiten der Katze.** in: Horzinek CM, Schmidt V und Lutz H eds., Anästhesie, Enke Verlag Stuttgart 2003;3:615-48
7. Amirahmadi SF, Wittingham S, Crombie DE, Nandakumar KS, Holmdahl R, Mackay IR, van Damme MP, Rowley MJ. **Arthritogenic anti-type II collagen antibodies are pathogenic for cartilage-derived chondrocytes independent of inflammatory cells.** Arthritis Rheum 2005;52:1897-906
8. Anderson EC, Hansen BE, Jacobsen H. **Definition of MHC and T cell receptor contacts in the HLA-DR4-restricted immunodominant epitope in type II collagen and characterization of collagen-induced arthritis in HLA-DR4 and human CD4 transgenic mice.** Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:7754-9
9. Andriopoulos NA, Mestecky J, Miller EJ, Bennett JC. **Antibodies to human native and denatured collagens in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis.** Clin Immunol Immunopathol 1976;6:209-12
10. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, Medsger TA, Mitchell DM, Neustadt DH, Pinals RS, Schaller JG, Sharp JT, Wilder RL, Hunder GG. **The American Rheumatism Association 1987 revised Criteria.** Arthritis Rheum 1988;31:315-24
11. Baatz H, Steinbauer M, Harris AG, Krombach F. **Kinetics of white blood cell staining by intravascular administration of rhodamine 6G.** Int J Microcirc Clin Exp 1995;15:85-91

12. Bäcklund J, Carlsen S, Höger T, Holm B, Fugger L, Kihlberg J, Burkhardt H, Holmdahl R. **Predominant selection of t cells specific for the glycosylated collagen type II epitope (263-270) in humanized transgenic mice and in rheumatoid arthritis.** Proc Natl Acad Sci USA 2002;99:9960-5
13. Bajtner E, Nandakumar KS, Engstrom A, Holmdahl R. **Chronic development of collagen-induced arthritis is associated with arthritogenic antibodies against specific epitopes on type II collagen.** Arthritis Res Ther 2005;7:1148-57
14. Barker JH, Hammersen F, Bondar I, Galla TJ, Menger MD, Gross W, Messmer K. **Direct monitoring of nutritive blood flow in a failing skin flap: the hairless mouse ear skin-flap model.** Plast Reconstr Surg 1989a;84:303-13
15. Barker JH, Hammersen F, Bondar I, Uhl E, Galla TJ, Menger MD, Messmer K. **The hairless mouse ear for in vivo studies of skin microcirculation.** Plast Reconstr Surg 1989b;83:948-59
16. Barreiro O, de la Fuente H, Mittelbrunn M, Sanchez-Madrid F. **Functional insights of the polarized redistribution of leukocyte integrins and their ligands during leukocyte migration and immune interactions.** Immunol Rev 2007;218:147-64
17. Barrett AJ. **The possible role of neutrophil proteinases in damage to articular cartilage.** Agents Action 1978;8:11-8
18. Beard HK, Ryvar R, Skingle J, Greenbury CL. **Anti-collagen antibodies in sera from rheumatoid arthritis patients.** J Clin Pathol 1980;33:1077-81
19. Becker KG, Simon RM, Bailey-Wilson JE, Freidlin B, Biddison BE, McFarland HF, Trent JM. **Clustering of non-major histocompatibility complex susceptibility candidate loci in human autoimmune disease.** Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:9979-84
20. Benson GJ, Thurmon JC. **Intravenous anesthesia.** Vet Clin North Am Equine Pract 1990;6:513-28
21. Beyeler C, Banks RE, Thompson D, Forbes MA, Cooper EH, Bird H. **Bone alkaline phosphatase in rheumatic diseases.** Ann Clin Biochem 1995;32:379-84
22. Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA Jr, Seed B. **Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins.** Science 1989;243:1160-5
23. Bingham CO 3rd. **The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation.** J Rheumatol Suppl 2002;65:3-9

24. Blake JA, Bult CJ, Eppig JT, Kardin JA, Richardson JE, Mouse Genome Database Group. **The Mouse Genome Database genotypes::phenotypes.** Nucleic Acids Res 2009;37:12-9
25. Böhm B, Deutzmann R, Burckhardt H. **Purification of a serine proteinase inhibitor from human articular cartilage: Identity with the acid-stable proteinase inhibitor of mucous secretions.** Biochem J 1991;274:269-73
26. Böhm B, Aigner T, Kinne R, Burkhardt H. **The serine proteinase inhibitor of cartilage matrix is not a chondrocytic gene product.** Eur J Biochem 1992;207:773-9
27. Bohlen HG, Gore RW. **Preparation of rat intestinal muscle and mucosa for quantitative microcirculatory studies.** Microvasc Res 1976;11:103-10
28. Bonney CH, Schmidt RE, Hunter DM, Conley GE. **Fluorescein angiography and light microscopy studies of retinas irradiated by oxygen nuclei.** Aviat Space Environ Med 1977;48:418-23
29. Boudier C, Laurent P, Bieth JG. **Leukoproteinases and pulmonary emphysema: cathepsin G and other chymotrypsin-like proteinases enhance the elastolytic activity of elastase on lung elastin.** Adv Exp Med Biol 1984;167:313-7
30. Boudier C, Carvallo D, Bruch M, Roitsch C, Courtney M, Bieth JG. **Human bronchial proteinase inhibitor: Rapid purification procedure and inhibition of leukocyte elastase in presence and in absence of human lung elastin.** Adv Exp Med Biol 1988;240:115-22
31. Brackertz D, Mitchell GF, Mackay IR. **Antigen-induced arthritis in mice. Induction of arthritis in various strains of mice.** Arthritis Rheum 1977;20:841-50
32. Brahn E, Peacock DJ, Banquerigo ML, Liu DY. **Effekts of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) on collagen arthritis.** Lymphokine Cytokine Res 1992;11:253-6
33. Bresnihan B, Alvaro-Garcia JM, Cobby M et al. **Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist.** Arthritis Rheum 1998;41:2196-204
34. Brunsberg U, Gustafsson K, Jansson L, Michaelsson E, Ahrlund-Richter L, Pettersson S, Mattsson R, Holmdahl R. **Expression of a transgenic class II Ab gene confers susceptibility to collagen-induced arthritis.** Eur J Immunol 1994;24:1698-702
35. Budinger TF, Taylor SE. **New approaches to targeting arthritis with radio-pharmaceuticals.** J Rheumatol 1995;22:62-7
36. Bullard DC, Hurley LA, Lorenzo I, Sly LM, Beaudet AL, Staite ND. **Reduced susceptibility to collagen-induced arthritis in mice deficient in intercellular adhesion molecule-1.** J Immunol 1996;157:3153-8

37. Burkhardt H, Kalden JR. **Animal models of autoimmune disease.** Rheumatol Int 1997a;17:91-9
38. Burkhardt H, Meyer P, Buchner E, Palombo-Kinne E, Heinzl-Wieland R, Becker W, Wolf F, Kalden JR, Kinne RW. **The serine proteinase inhibitor antileukoproteinase specifically accumulates in normal but not in arthritic cartilage.** J Rheumatol 1997b;24:1145-54
39. Burkhardt H, Koller T, Engstrom A, Nandakumar KS, Turnay J, Kraetsch HG, Kalden JR, Holmdahl R. **Epitope-specific recognition of type II collagen by rheumatoid arthritis antibodies is shared with recognition by antibodies that are arthritogenic in collagen-induced arthritis in mouse.** Arthritis Rheum 2002;46:2339-48
40. Burkhardt H und Möller B. **Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis.** Pharm. Unserer Zeit 2003;5:368-74
41. Butcher EC. **Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity.** Cell 1991;67:1033-6
42. Carroll GL und Hartsfield SM. **General anesthetic techniques in ruminants.** Vet Clin North Am Food Anim Pract 1996;12:627-61
43. Carter RA, Campbell IK, O'Donnel KL, Wicks IP. **Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) blockade in collagen-induced arthritis reduces joint involvement and alters B cell trafficking.** Clin Exp Immunol 2002;128:44-51
44. Cathcart ES, Hayes WA, Gonnermann WA, Lazarri AA, Franzblau C. **Experimental Arthritis in a nonhuman primate. Induction by bovine type II collagen.** Lab Invest 1986;54:26-31
45. Chávez-Cartaya RE, Romero PR, Jamieson NV. **Haemoglobin saturation in the rat liver after ischaemia and reperfusion: Study using a laser photometry technique and correlation with changes in liver tissue blood flow.** Eur Surg Res 1995;27:82-92
46. Choy EH und Panayi. **Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis.** N Engl J Med 2001;344:907-16
47. Cimmino MA, Buffrini L, Barisone G, Goll HG, Oremek G. **Alkaline phosphatase activity in the serum of patients with rheumatoid arthritis.** Zeitscher Rheumatol 1990;49:143-6
48. Clark IM, Powell LK, Ramsey S, Hazleman BL, Cawston TE. **The measurement of collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP), and collagenase-TIMP complex in synovial fluid from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis.** Arthritis Rheum 1993;36:372-9

49. Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. **Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF- κ B and cytokine-inducible enhancers.** FASEB J 1995;9:899-909
50. Conzen P, Hobbhahn J, Goetz AE, Habazettl H, Granetzny T, Peter K, Brendel W. **Splanchnic oxygen consumption and hepatic surface oxygen tensions during isoflurane anesthesia.** Anesthesiology 1988;69:643-51
51. Cook AD, Rowley MJ, Mackay IR, Gough A and Emery P. **Antibodies to type II collagen in early rheumatoid arthritis. Correlation with disease progression.** Arthritis Rheum 1996;39:1720-7
52. Cooke TD und Jasin HE. **The pathogenesis of chronic inflammation in experimental antigen-induced arthritis. The role of antigen on the local immune response.** Arthritis Rheum 1972;15:327-37
53. Cooper WO, Fava RA, Gates CA, Cremer MA, Townes AS. **Acceleration of onset of collagen-induced arthritis by intra-articular injection of tumor necrosis factor or transforming growth factor-beta.** Clin Exp Immunol 1992;163:491-9
54. Corthay A, Johansson A, Vestberg M, Holmdahl R. **Collagen-induced arthritis development requires alpha beta T cells but not gamma delta T cells: studies with T cell-deficient (TCR mutant) mice.** Int Immunol 1999;11:1065-73
55. Courtenay JS, Dallmann MJ, Dayan AD, Martin A, Mosedale B. **Immunisation of against heterologous type II collagen induces arthritis in mice.** Nature 1980;283:666-8
56. Cowley HC , Heney D , Gearing AJH , Hemingway I , Webster NR. **Increased circulating adhesion molecule concentrations in patients with systemic inflammatory response syndrome: A prospective cohort study.** Crit Care Med 1994;22:651-7
57. Davis P, Johnston C. **Effects of gold compounds on function of phagocytic cells. Comparative inhibition of activated polymorphonuclear leukocytes and monocytes from rheumatoid arthritis and control subjects.** Inflammation 1986;10:311-20
58. De Benedetti F, Vivarelli M, Pignatti P, Oliveri M, Massa M, Pistorio A, Martini A. **Circulating levels of soluble E-selectin, P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 in patients with juvenile idiopathic arthritis.** J Rheumatol 2000;27:2246-50
59. DiPiro JT. **Cytokine networks with infection: mycobacterial infections, leishmaniasis, human immunodeficiency virus infection, and sepsis.** Pharmacotherapy 1997;17:205-23
60. Drosos AA. **Newer immunosuppressive drugs: their potential role in rheumatoid arthritis therapy.** Drugs 2002;62:891-907

61. Dumonde DC and Glynn LE. **The production of arthritis in rabbits by an immunologic reaction to fibrin.** Br J Exp Pathol 1962;43:373-83
62. Dunn KW, Sandoval RM, Kelly KJ, Dagher PC, Tanner GA, Atkinson SJ, Bacallao RL, Molitoris BA. **Functional studies of the kidney of living animals using multicolor two-photon microscopy.** Am J Physiol Cell Physiol 2002;283:905-16
63. Elias H, Petty D. **Terminal distribution of the hepatic artery.** Anat Rec 1953;116:9-17
- Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. **Role of cytokines in rheumatoid arthritis.** Annu Rev Immunol 1996;14:397-440
64. Feldmann M, Brennan FM, Williams RO, Woody JN, Maini RN. **The transfer of a laboratory based hypothesis to a clinically useful therapy: the development of anti-TNF therapy of rheumatoid arthritis.** Best Pract Res Clin Rheumatol 2004;18:59-80
65. Firestein GS. **Evolving concepts of rheumatoid arthritis.** Nature 2003;423:356-61
66. Forsman AD, McCormack JT. **Microcorrosion casts of hamster luteal and follicular vasculature throughout the estrous cycle.** Anat Rec 1992;233:515-20
67. Frank O, Klemmayer K. **Die alkalische Serumphosphatase bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises und ihre Beeinflussung durch Kortikosteroide.** Z Rheumaforsch 1968;27:142-9
68. Fujisawa K, Aono H, Hasunuma T, Yamamoto K, Mita S, Nishioka K. **Activation of transcription factor NF κ B in human synovial cells in response to tumor necrosis factor α .** Arthritis Rheum 1996;39:197-203
69. Funk RHW, Tischendorf R, Bratengeier H. **Mikroendoscopy of the synovial vasculature in the rabbit knee joint.** Microvasc Res 1995;50:45-50
70. Furutani Y, Kato A, Yasue H, Alexander LJ, Beattie CW, Hirose S. **Evolution of the trappin multigene family in the Suidae.** J Biochem 1998;124:491-502
71. Gál I, Bajnok E, Szántó S, Sarraj B, Glant TT, Mikecz K. **Visualization and in situ analysis of leukocyte trafficking into the ankle joint in a systemic murine model of rheumatoid arthritis.** Arthritis Rheum 2005;52:3269-78
72. Gamble JR, Harlan JM, Klebanoff SJ, Vadas MA. **Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor.** Proc Natl Acad Sci USA 1985;82:8667-71
73. Garver RIJ, Goldsmith KT, Rodu B, Hu PC, Sorscher EJ, Curiel DT. **Strategy for achieving selective killing of carcinomas.** Gene Ther 1994;1:46-50

74. Gierer P, Ibrahim S, Mittlmeier T, Koczan D, Landes J, Gradl G, Vollmar B. **Gene expression profile and synovial microcirculation at early stages of collagen-induced arthritis.** *Arthritis Res Ther* 2005;7:868-76
75. Ginsberg MH, Du X, Plow EF. **Inside-out integrin signalling.** *Curr Opin Cell Biol* 1992;4:766-71
76. Gjerttson I, Hultgren OH, Collins LV, Pettersson S, Tarkowski A. **Impact of transcription factors AP-1 and NF-kappaB on the outcome of experimental Staphylococcus aureus arthritis and sepsis.** *Microbes Infect* 2001;3:527-34
77. Glant TT, Mikecz K, Arzoumanian A, Poole AR. **Proteoglycan-induced arthritis in BALB/c mice: clinical features and histopathology.** *Arthritis Rheum* 1987;30:201-12
78. Glant TT, Finnegan A, Mikecz K. **Proteoglycan-induced arthritis: immune regulation, cellular mechanisms and genetics.** *Crit Rev Immunol* 2003;23:199-250
79. Granger DN, Kubes P. **The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion.** *J Leukoc Biol* 1994;55:662-75
80. Gray RE, Seng N, Mackay IR, Rowley MJ. **Measurement of antibodies to collagen II by inhibition of collagen fibril formation in vitro.** *J Immunol Methods* 2004;285:55-61
81. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. **The shared epitope hypothesis: an approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 1987;30:1205-13
82. Grütter MG, Fendrich G, Huber R, Bode W. **The 2.5 Å X-ray crystal structure of the acid-stable proteinase inhibitor from human mucous secretions analysed in its complex with bovine alpha-chymotrypsin.** *Embo J* 1988;7:345-51
83. Hamilton TA, Ohmori Y, Tebo J. **Regulation of chemokine expression by antiinflammatory cytokines.** *Immunol Res* 2002;25:229-45
84. Hang L, Theofopoulos AN, Dixon FJ. **A spontaneous rheumatoid-like disease in MRL/1 mice.** *J Exp Med* 1982;155:1690-701
85. Hardy J, Bertone AL, Muir WW. **Joint pressure influences synovial tissue blood flow as determined by coloured microspheres.** *J Appl Physiol* 1996;80:1225-32
86. Harris AG, Steinbauer M, Leiderer R, Messmer K. **Role of leukocyte plugging and edema in skeletal muscle ischemia-reperfusion injury.** *Am J Physiol* 1997;273:989-96
87. Hart BA, Bakker NPM, Jonker M, Bontrop RE. **Resistance to collagen-induced arthritis in rats and rhesus monkeys after immunization with attenuated type II collagen.** *Eur J Immunol* 1993;23:1588-94

88. Van der Heijde DM, van Leeuwen MA, van Riel PL, Koster AM, van't Hof MA, van Rijswijk MH, van de Putte LB. **Biannual radiographic assessments of hands and feet in a three-year prospective followup of patients with early rheumatoid arthritis.** Arthritis Rheum 1992;35:26-34
89. Heinzl R, Appelhans R, Gassen G, Seemüller U, Machleidt W, Fritz H, Steffens G. **Molecular cloning and expression of cDNA for human antileukoprotease from cervix uterus.** Eur J Biochem 1986;160:61-7
90. Heinzl-Wieland R, Steffens GJ, Flohe L. **Inhibitory characteristics and oxidant resistance of site specific variants of recombinant human antileukoproteinase (ALP).** Biomed Biochem Acta 1991;50:677-81
91. Hempfling H. **Mikroarthroendoskopie.** Arthroskopie 1996;9:106-15
92. Henderson B, Edwards JCW. **The synovial lining.** London, Chapman & Hall 1987
93. Hernandez LA, Grisham MB, Twohig B, Arfors KE, Harlan JM, Granger DN. **Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury.** Am J Physiol 1987;253:699-703
94. Hickey MJ, Issekutz AC, Reinhardt PH, Fedorak RN, Kubes P. **Endogenous interleukin-10 regulates hemodynamic parameters, leukocyte-endothelial cell interactions, and microvascular permeability during endotoxemia.** Circ Res 1998;83:1124-31
95. Hiemstra PS, Maassen RJ, Stolk J, Heinzl-Wieland R, Steffens GJ, Dijkman JH. **Antibacterial activity of antileukoprotease.** Infect Immun 1996; 64:4520-4
96. Hietala MA, Jonsson IM, Tarkowski A, Kleinau S, Pekna M. **Complement deficiency ameliorates collagen-induced arthritis in mice.** J Immunol 2002;169:454-9
97. Hietala MA, Nandakumar KS, Persson L, Fahlen S, Holmdahl R, Pekna M. **Complement activation by both classical and alternative pathways is critical for the effector phase of arthritis.** Eur J Immunol 2004;34:1208-16
98. Hogg N, Henderson R, Leitinger B, McDowal A, Porter J, Stanley P. **Mechanism contributing to the activity of integrins on leukocytes.** Immunol Rev 2002;186:164-71
99. Hom JT, Stuart JM, Tovey J, Chiller JM. **Murine T cells reactive to type II collagen. Functional characterization.** J Immunol 1986;136:769-75
100. Holmdahl R, Klareskog L, Rubin K, Larsson E, Wigzell H. **T lymphocytes in collagen-induced arthritis in mice. Characterization of arthritogenic collagen II-specific T-cell lines and clones.** Scand J Immunol 1985a;22:295-306
101. Holmdahl R, Janosson L, Larsson E, Rubin K, Kloseskoy L. **Chronic and progressive arthritis in mice induced with homologous collagen type II.** Arth Rheum 1985b;29:106-13

102. Holmdahl R, Rubin K, Klareskog L, Larsson E and Wigzell H. **Characterization of the antibody response in mice with type II collagen-induced arthritis; using monoclonal anti-type II collagen antibodies.** Arthritis Rheum 1986;29:400-10
103. Holmdahl R, Anderson M, Goldschmidt TJ, Gustafsson K, Janosson L, Mo JA. **Type II collagen autoimmunity in animals and provocations leading to arthritis.** Immunol Rev 1990;118:193-232
104. Holmdahl R, Tarkowski A, Jonsson R. **Involvement of macrophages and dendritic cells in synovial inflammation of collagen-induced arthritis in DBA/1 mice and spontaneous arthritis in MRL/lpr mice.** Autoimm 1991;8:271-80
105. Holmdahl R, Jansson L, Andersson M, Jonsson R. **Genetic, hormonal and behavioural influence on spontaneously developing arthritis in normal mice.** Clin Exp Immunol 1992;88:467-72
106. Hynes RO. **Integrins: bidirectional, allosteric signalling machines.** Cell 2002;110:673-87
107. Ibrahim SM, Koczan D, Thiesen HJ. **Gene-Expression Profile of Collagen-induced Arthritis.** J Autoimmunity 2002;18:159-67
108. Iigo Y, Takashi T, Tamatani T, Miyasaka M, Higashida T, Yagita H, Okumura H, Tsukada W. **ICAM-1-dependent pathway is critically involved in the pathogenesis of adjuvant arthritis in rats.** J Immunol 1991;147:4167-71
109. Issekutz AC, Mu JY, Liu G, Melrose J, Berg EL. **E-selectin, but not P-selectin, is required for development of adjuvant-induced arthritis in the rat.** Arthritis Rheum 2001;44:1428-37
110. Issekutz AC, Nakazato S, Issekutz TB. **Differential roles of VLA-4 (CD49a/CD29) and LFA-1 (CD11a/CD18) integrins and E- and P-Selektin during developing and established active or adoptively transferred adjuvant arthritis in the rat.** Immunol Cell Biol 2003;81:397-408
111. Itoh T, Matsuda H, Tanioka M, Kuwabara K, Itohara S, Suzuki R. **The role of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in antibody-induced arthritis.** J Immunol 2002;169:2643-7
112. Jackson JR, Seed MP, Kircher CH, Willoughby DA, Winkler JD. **The codependence of angiogenesis and chronic inflammation.** FASEB J 1997;11:457-65
113. Jasin HE, Lightfoot E, Davis LS, Rothein R, Faanes RB, Lipsky PE. **Amelioration of antigen-induced arthritis in rabbits treated with monoclonal antibodies to leukocyte adhesion molecules.** Arthritis Rheum 1992;35:541-9

114. Jin F, Nathan C, Radzioch D, Ding A. **Secretory leukocyte protease inhibitor: a makrophage product induced by and antagonistic to bacterial lipopolysaccharide.** Cell 1997;88:417-26
115. Jirholt J, Cook A, Emahazion T, Sundvall M, Jansson L, Nordquist N, Petersson U, Holmdahl R. **Genetic linkage analysis of collagen-induced arthritis in mice.** Eur J Immunol 1998;28:3321-8
116. Johansson AC, Hansson AS, Nandakumar KS, Backlund J, Holmdahl R. **IL-10-deficient B.10.Q mice develop more severe collagen-induced arthritis, but are protect from arthritis induced with anti-type II collagen antibodies.** J Immunol 2001;167:3505-12
117. Johnson BA, Haines GK, Harlow LA, Koch AE. **Adhesion molecule expression in human synovial tissue.** Arthritis Rheum 1993;36:137-46
118. Jones SL, Wang J, Turck CW, Brown EJ. **A role for the actin-bundling protein L-plastin in the regulation of leukocyte integrin function.** Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:9331-6
119. Jung U, Ley K. **Mice lacking two or all three selections demonstrate overlapping and distinct functions for each selectin.** J Immunol 1999;162:6755-62
120. Kagari T, Doi H, Shimozaoto T. **The importance of Il-1 beta and TNF-alpha, and the noninvolvement of Il-6, in the development of monoclonal antibody-induced arthritis.** J Immunol 2002;169:1459-66
121. Kakimoto K, Nakamura T, Ishii K, Takashi T, Iigou H, Yagati H, Okumura K, Onoue K. **The effect of anti-adhesion molecule antibody on the development of collagen-induced arthritis.** Cell Immunol 1992;142:326-37
122. Karin M, Ben Neriah Y. **Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity.** Annu Rev Immunol 2000;18:621-63
123. Kato H, Nishida K, Yoshida A, Takada I, McCown C, Matsuo M, Murakami T, Inoue H. **Effect of NOS2 gene deficient on the development of autoantibody mediated arthritis and subsequent articular cartilage degeneration.** J Rheumatol 2003;30:247-55
124. Kendall MJ, Cockel R, Becker J, Hawkins CF. **Raised serum alkaline phosphatase in rheumatoid disease. An index of liver dysfunction?** Ann Rheum Dis 1970;29:537-40
125. Kim MB, Sarelius IH. **Regulation of leukocyte recruitment by local wall shear rate and leukocyte delivery.** Microcirculation 2004;11:55-67
126. Kirveskari J, Helinto M, Saaren-Seppala H, Renkonen R, Tervo T. **Leukocyte rolling and extravasation in surgical inflammation after mechanical and laser-induced trauma in human patients.** Exp Eye Res 2003;77:387-90

127. Klareskog L, Holmdahl R, Larsson E, Wigzell H. **Role of T lymphocytes in collagen II induced arthritis in rats.** Clin Exp Immunol 1983;51:117-25
128. Kleinau S, Martinsson P und Heyman B. **Induction and suppression of collagen-induced arthritis is dependent on distinct fcgamma receptors.** J Exp Med 2000;191:1611-6
129. Klyszcz T, Junger M, Jung F, Zeintl H. **Cap image - a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy.** Biomed Tech 1997;42:168-75
130. Koch AE, Halloran MM, Haskell CJ, Shah MR, Polverini PJ. **Angiogenesis mediated by soluble forms of E-selectin and ascular adhesion molecule-1.** Nature 1995;376:517-9
131. Van Kooyk Y und Figdor CG. **Activation and inactivation of adhesion molecules.** Curr top Microbiol Immunol 1993;184:235-64
132. Kraetsch HG, Unger C, Wernhoff P, Schneider C, Kalden JR, Holmdahl R, Burkhardt H. **Cartilage-specific autoimmunity in rheumatoid arthritis: characterization of a triple helical B-cell epitope in the integrin-binding-domain of collagen type II.** Eur J Immunol 2001;31:1666-73
133. Kramps JA, Franken C, Dijkman JH. **Quantity of antileukoprotease relative to a1-proteinase inhibitor in peripheral airspaces of the human lung.** Clin Sci 1988;75:351-3
134. Kramps JA, Rudolphus A, Stolk J, Willems LNA, Dijkman JH. **Role of antileukoprotease in human lung.** Ann NY Acad Sci 1991a;624:97-108
135. Kramps JA, Willems LNA, De Water R, Franken C, Dijkman JH. **Bronchial secreting cells and antileukoprotease.** Masson, Milan 1991b:235-45
136. Kubes P, Kerfoot SM. **Leukocyte recruitment in the microcirculation: the rolling paradigm revisited.** News Physiol Sci 2001;16:76-80
137. Kunkel EJ, Ley K. **Distinct phenotype of E-selectin-deficient mice. E-selectin is required for slow leukocyte rolling in vivo.** Circ Res 1996;79:1196-204
138. Kunkel EJ, Dunne JL, Ley K. **Leukocyte arrest during cytokine dependent inflammation in vivo.** J Immunol 2000;164:3301-8
139. Kuruvilla AP, Shah R, Hochwald GM, Liggitt HG, Palladino MA, Thorbecke GJ. **Protective effect of transforming growth factor on experimental autoimmune diseases in mice.** Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:2918-21
140. Lavon I, Goldberg I, Amit S, Landsman L, Jung S, Tsuberi BZ, Barshack I, Kopolovic J, Galun E, Bujard H, Ben-Neriah Y. **High susceptibility to bacterial infection, but no liver**

dysfunction, in mice compromised for hepatocyte NF-kappaB activation. Nat Med 2000;6:573-7

141. Lawrence MB, Springer TA. **Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins.** Cell 1991;65:859-73

142. Lawrence T, Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willoughby DA. **Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation.** Nat Med 2001;7:1291-7

143. Lehr HA, Leunig M, Menger MD, Nolte D, Messmer K. **Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice.** Am J Pathol 1993;143:1055-62

144. Lentsch AB, Yoshidome H, Warner RL, Ward PA, Edwards MJ. **Secretory leukocyte protease inhibitor in mice regulates local and remote organ inflammatory injury induced by hepatic ischemia/reperfusion.** Gastroenterology 1999;117:953-61

145. Lentsch AK und Ward PA. **Regulation of inflammatory vasculare damage.** J Pathol 2000;190:343-8

146. Levick JR, Smaje LH. **An analysis of the permeability of a fenestra.** Microvasc Res 1987;33:233-56

147. Liberek T, Chmielewski M, Lichodziejewska-Niemierko M, Lewandowski K, Rutkowski B. **Transmigration of blood leukocytes into the peritoneal cavity is related to the upregulation of ICAM-1 (CD54) and Mac-1 (CD11b/CD18) adhesion molecules.** Perit Dial Int 2004;24:139-46

148. Liddington RC, Ginsberg MH. **Integrin activation takes shape.** J Cell Biol 2002;158:833-9

149. Lin CS, Aebersold RH, Kent SB, Varma M, Leavitt J. **Molecular cloning and characterization of plastin, a human leukocyte protein expressed in transformed human fibroblasts.** Mol Cell Biol 1988;8:4659-68

150. Lipsky PE. **Rheumatoide Arthritis.** Harrison-Innere Medizin 1999;2211-21

151. Loutis N, Bruckner P and Pataki A. **Induction of erosive arthritis in mice after passive transfer of anti-type II collagen antibodies.** Agents and actions 1988;25:353-9

152. Luscinskas FW, Ding H Lichtman AH. **P-selectin and vascular cell adhesion molecule 1 mediate rolling and arrest, respectively, of CD4+ T lymphocytes on tumor necrosis factor alpha-activated vascular endothelium under flow.** J Exp Med 1995;181:1179-86

153. Luross JA, Williams NA. **The genetic and immunopathological process underlying collagen-induced arthritis.** Immunology 2001;103:407-16

154. Maeda T, Saikawa I, Hotokebuchi T, Sugioka Y, Eto M, Murakami Y, and Nomoto K. **Exacerbation of established collagen-induced arthritis in mice treated with an anti-T cell receptor antibody.** *Arthritis Rheum* 1994;37:406-13
155. Mansson P, Zhang XW, Jeppsson B, Johnell O, Thorlacius H. **Critical role of P-selectin-dependent rolling in tumor necrosis factor-alpha-induced leukocyte adhesion and extravascular recruitment in vivo.** *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000;362:190-6
156. McElvaney NG, Nakamura H, Birrer P, Hebert CA, Wong WL, Alphonso M, Baker JB, Catalano MA, and Crystal RG. **Modulation of airway inflammation in cystic fibrosis. In vivo suppression of interleukin-8 levels on the respiratory epithelial surface by aerolization of recombinant secretory leukoprotease inhibitor.** *J Clin Invest* 1992;90:1296-301
157. McKee Olds J, Stafford ES. **On the manner of anastomosis of the hepatic and portal circulations.** *John Hopkins Bull* 1930;47:176-85
158. Mc Neely TB, Dealy M, Dripps DJ, Orenstein JM, Eisenberg SP, Wahl SM. **Secretory leukocyte protease inhibitor: a human saliva protein exhibiting anti-human immunodeficiency virus 1 activity in vitro.** *J Clin Invest* 1995;96:456-64
159. Menger MD, Steiner D, Messmer K. **Microvascular ischemia/reperfusion injury in striated muscle: Significance of "no reflow".** *Am J Physiol* 1992a;263:1892-900
160. Menger MD, Pelikan S, Steiner D, Messmer K. **Microvascular ischemia/reperfusion injury in striated muscle: Significance of „reflow-paradox“.** *Am J Physiol* 1992b;263:1901-6
161. Menger MD, Lehr HA. **Scope and perspectives of intravital microscopy-bridge over from in vitro to in vivo.** *Immunol Today* 1993;14:519-22
162. Menger MD, Vollmar B. **Adhesion molecules as determinants of disease: from molecular biology to surgical research.** *Br J Surg* 1996;83:588-601
163. Menger MD, Richter S, Yamauchi JI, Vollmar B. **Intravital microscopy for the study of the microcirculation in various disease states.** *Ann Acad Med Singapore* 1999;28:542-56
164. Mitamura M, Nakano N, Yonekawa T, Shan L, Kaise T, Kobayashi T, Yamashita K, Kikkawa H, Kinoshita M. **T cells are involved in the development of arthritis induced by anti-type II collagen antibody.** *Int Immunopharmacol* 2007;7:1360-8
165. Mizgerd JP, Kubo H, Kutkoski GJ, Bhagwan SD, Scharffetter-Kochenak K, Beaudet AL, Doerschuk CM. **Neutrophil emigration in the skin, lungs and peritoneum: different**

- requirements for CD11/CD18 revealed by CD18-deficient mice.** J Exp Med 1997;186:1357-64
166. Mo JA, Holmdahl R. **B cell response to autologous type II collagen: biased V gene repertoire with V gene sharing and epitope shift.** J Immunol 1996;157:2440-8
167. Moder K, Luthra HS, Kubo R, Griffiths M, and David CS. **Prevention of collagen-induced arthritis in mice by treatment with an antibody directed against the T cell receptor alpha beta framework.** Autoimmunity 1992;11:219-24
168. Muir WW, Skarda RT, Sheehan W. **Hemodynamic and respiratory effects of a xylazine-acetylpromazine drug combination in horses.** Am J Vet Res 1979;40:1518-22
169. Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM. **PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes.** J Exp Med 1993;178:449-60
170. Muller WA. **The role of PECAM-1 (CD31) in leukocyte emigration: studies in vitro and in vivo.** J Leukoc Biol 1995;57:523-8
171. Muller WA. **Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response.** Lab Invest 2002;82:521-33
172. Murata K, Inami M, Hasegawa A, Kubo S, Kimura M, Yamashita M, Hosokawa N, Nagao T, Suzuki K, Hashimoto K, Shinkai H, Koseki H, Taniguchi M, Ziegler SF, Nakayama T. **CD69-null mice protected from arthritis induced with anti-type II collagen antibodies.** Int Immunol 2003;15:987-92
173. Myers LK, Rosloniec EF, Cremer MA, Kang AH. **Collagen-induced arthritis, an animal model of autoimmunity.** Life Sci 1997;61:1861-78
174. Nakamura Am Mori Y, Hagiwara K, Suzuki T, Sakakibara T, Kikuchi T. **Increased susceptibility to LPS-induced endotoxin shock in secretory leukoprotease inhibitor (SLPI)-deficient mice.** J Exp Med 2003; 197:669-74
175. Nandakumar KS, Andren M, Martinsson P, Bajtner E, Hellström S, Holmdahl R, Kleinau S. **Induction of arthritis by single monoclonal IgG anti-collagen type II antibodies and enhancement of arthritis in mice lacking inhibitory FcγRIIB.** Eur J Immunol 2003a;33:2269-77
176. Nandakumar KS, Svensson L, Holmdahl R. **Collagen type II-specific monoclonal antibody-induced arthritis in mice: description of the disease and the influence of age, sex and genes.** Am J Pathol 2003b;163:1827-37
177. Nandakumar KS, Backlund J, Vestbrg M, Holmdahl R. **Collagen type II (CII)-specific antibodies induce arthritis in the absence of T or B cells but the arthritis progression is enhanced by CII-reactive T cells.** Arthritis Res Ther 2004;6:544-50

178. Nandakumar KS, Holmdahl R. **A genetic contamination in MHC-congenic mouse strains reveals a locus on chromosom 10 that determines autoimmunity and arthritis susceptibility.** Eur J Immunol 2005a;35:1275-82
179. Nandakumr KS un dHolmdahl R. **Efficient promotion of collagen antibody induced arthritis (CAIA) using four monoclonal antibodies specific for the major epitopes recognized in both collagen induced arthritis and rheumatoid arthritis.** J Immunol Methods 2005b;304:126-36
180. Nandakumar KS, Holmdahl R. **Arthritis induced with cartilage-specific antibodies is IL-4-dependent.** Eur J Immunol 2006;36:1608-18
181. Nandakumar KS, Holmdahl R. **Collagen antibody induced arthritis.** Methods Mol Med 2007;136:215-23
182. Nanke Y, Akama H, Hara M, Kashiwazaki S. **Alkaline phosphatase activity in rheumatoid arthritis: its clinical significance and synthesis of ALP in RA synovium.** Ryumachi 1998;38:581-8
183. Nolte D, Schmid P, Jäger U, Botzlar A, Roesken F, Hecht R, Uhl E, Messmer K, Vestweber D. **Leukocyte rolling in venules of striated muscle and skin is mediated by P-Selectin, not by L-Selectin.** Am J Physiol 1994;267:1637-42
184. Nolte D, Zeintl H, Steinbauer M, Pickelmann S, and Messmer K. **Functional capillary density: an indicator of tissue perfusion?** Int J Microcirc Clin Exp 1995;15:244-9
185. Norman MU und Hickey MJ. **Mechanism of lymphocyte migration in autoimmune disease.** Tissue Antigens 2005;66:163-72
186. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer L. **Interleukin-10: a complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug.** Crit Care Med 2002;30:58-63
187. O'Dell JR. **Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis.** N Engl J Med 2004;350:2591-602
188. Okada Y, Watanabe S, Nakanishi I, Kishi J, Hayakawa T, Watorek W, Travis J, Nagase H. **Inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinases by neutrophil elastase and other serine proteinases.** FEBS Lett 1988;229:157-60
189. Okada Y, Nakanishi I. **Activation of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) and matrix metalloproteinase 2 (gelatinase') by human neutrophil elastase and cathepsin G.** FEBS Lett 1989;249:353-6

190. Osman GE, Cheunsuk S, Allen SE, Chi E, Liggitt HD, Hood LE, Ladiges WC. **Expression of a type II collagen-specific TCR transgene accelerates the onset of arthritis in mice.** Intern Immunol 1998;10:1613-22
191. Osman GE, Hannibal MC, Anderson JP, Lasky SR, Ladiges WC, Hood L. **FVB/N (H2q) mouse is resistant to arthritis induction and exhibits a genomic deletion of T-cell receptor V beta gene segments.** Immunogenetics 1999;49:851-9
192. Tanaka A, O'Sullivan TX, Koopman WJ, Gay S. **Etiopathogenesis of rheumatoid-arthritis like disease in MRL/1 mice. Ultrastructural basis of joint destruction.** J Rheumatol 1988;15:10-6
193. Paleolog EM, Hunt M, Elliott MJ, Feldmann M, Maini RN, Woody JN. **Deactivation of vascular endothelium by monoclonal anti-tumor necrosis factor alpha antibody in rheumatoid arthritis.** Arthritis Rheum 1996;39:1082-91
194. Pearson CH and Wood FD. **Studies of polyarthritis and other lesions induced in rats given adjuvants.** Arthritis Rheum 1959;2:440-59
195. Perkins ND. **Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function 1.** Nat Rev Mol Cell Biol 2007;8:49-62
196. Piguet PF, Grau GE, Vesin C, Loetscher H, Gentz R, Lesslauer W. **Evolution of collagen arthritis in mice is arrested by treatment with anti-tumor necrosis factor (TNF) antibody or recombinant soluble TNF receptor.** Immunology 1992;14:510-4
197. Plant MJ, Saklatvala J, Borg AA, Jones PW, Dawes PT. **Measurement and prediction of radiological progression in early rheumatoid arthritis.** J Rheumatol 1994;21:1808-13
198. Plumb DC. **Veterinary Drug Handbook.** Can Vet J, 2003;297
199. Ravetch JV, Kinet JP. **Fc receptors.** Annu Rev Immunol 1991;9:457-92
200. Read MA, Neish AS, Luscinskas F., Palombella VJ, Maniatis T, Collins T. **The proteasome pathway is required for cytokine induced endothelial-leukocyte adhesion molecule expression.** Immunity 1995;2:493-506
201. Rieber EP. **Grundlagen der Immunologie.** HW Baenkler (ED.): Medizinische Immunologie, Band 1, 1995;89-160
202. Rumbaut RE, Sial AJ. **Differential phototoxicity of fluorescent dye-labeled albumin conjugates.** Microcirculation 1999;6:205-13
203. Saumet JL, Dittmar A, Leftheriotis G. **Non-invasive measurement of skin blood flow: comparison between plethysmography, laser-Doppler flowmeter and heat thermal clearance method.** Int J Microcirc Clin Exp 1986;5:73-83

204. Schalkwijk J, Wiedow O, Hirose S. **The trappin gene family: proteins defined by an N-terminal transglutaminase substrate domain and a C-terminal four-disulphide core.** *Biochem J* 1999;340:569-77
205. Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoggen FH, van de Putte LB, van Venrooij. **Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies.** *J Clin Invest* 1998;101:273-81
206. Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, van den Hoogen FH, Hazes JM, Breedveld FC, van Venrooij WJ. **The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide.** *Arthritis Rheum* 2000;43:155-63
207. Schulte S, Unger C, Mo JA, Wendler O, Bauer E, Frischholz S, von der Mark K, Kalden JR, Holmdahl R, Burkhardt H. **Arthritis-related B cell epitopes in collagen II are conformation-dependent and sterically privileged in accessible sites of cartilage collagen fibrils.** *J Biol Chem* 1998;273:1551-61
208. Schulze-Koops H, Davis LS, Haverty TP, Wacholtz MC, Lipsky PE. **Reduction of Th1 cell activity in the peripheral circulation of patients with rheumatoid arthritis after treatment with a non-depleting humanized monoclonal antibody to CD4.** *J Rheumatol* 1998; 25:2065-76
209. Scott DL. **Prognostic factors in early rheumatoid arthritis.** *Rheumatology (Oxford)* 2000; 39:24-9
210. Seemüller U, Arnhold M, Fritz H, Wiedenmann K, Machleidt W, Heinzel R, Appelhaus H, Gassen HG, Lottspeich F. **The acid-stable proteinase inhibitor of human mucous secretions (HUSI-I, antileukoproteinase): complete amino acid sequence as revealed by protein and cDNA sequencing and structural homology to whey proteins and Red Sea turtle proteinase inhibitor.** *FEBS Lett* 1986;199:8-43
211. Sehnert B, Cavcic, Böhm B, Kalden JR, Nandakumar KS, Holmdahl R, Burkhardt H. **Antileukoproteinase: Modulation of neutrophil function and therapeutic effects on anti-type II collagen antibody-induced arthritis.** *Arthritis Rheum* 2004;50:2347-59
212. Sehnert B, Gierer P, Ibrahim S, Kühl A, Voll R, Nandakumar KS, Holmdahl R, Hallmann R, Vollmar B, Burkhardt H. **Modulation of granulocyte-endothelium interactions by antileukoproteinase: inhibition of anti-type II collagen antibody-induced leukocyte attachment to the synovial endothelium.** *Arthritis Res Ther* 2006;8:R95
213. Seki N, sudo Y, Yoshioka T, Sugihara S, Fujitsu T, Sakuma S, Ogawa T, Hamaoka T, Senoh H, Fujiwara H. **Type II collagen-induced murine arthritis. Induction and**

- perpetuation of arthritis require synergy between humoral and cell-mediated immunity.** J Immunol 1988;140:1477-84
214. Sewell KL, Trendelenburg D. **Pathogenesis of rheumatoid arthritis.** Lancet 1993;341:283-6
215. Sha WC, Liou HC, Tuomanen EI, Baltimore D. **Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kappa B leads to multifocal defects in immune response.** Cell 1995;80:321-30
216. Shang XZ, Issekutz AC. **Enhancement of monocyte transendothelial migration by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: requirement for chemoattractant and CD11a/CD18 mechanisms.** Eur J Immunol 1999;29:3571-82
217. Shong M, Ro HK, Kim YK, Yoo CJ, Lee JH, Song CU, Cho BY. **The cytokines, interleukin-1 beta, interleukin-6 and interferon-gamma upregulate the expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in rat thyroid cell line, FRTL-5.** Korean J Intern Med 1994;8:88-92
218. Siede WH, Seiffert UB, Merle S, Goll HG, Oremek G. **Alkaline phosphatase isoenzymes in rheumatic diseases.** Clin Biochem 1989;22:121-4
219. Sieper J, Burkhardt H, Gross WL. **Immunopathogenetische Vorstellungen bei entzündlich-rheumatischen Erkrankungen.** 2001;42:198-210.
220. Song X, Zeng L, Jin W, Thompson J, Mizel DE, Lei K, Billingham RC, Poole AR, Wahl SM. **Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses the inflammation and joint damage of bacterial cell wall-induced arthritis.** J Exp Med 1999;190:535-42
221. Spooner RJ, Smith DH, Bedford D, Beck PR. **Serum gammaglutamyltransferase and alkaline phosphatase in rheumatoid arthritis.** J Clin Pathol 1982;35:638-41
222. Springer TA. **Adhesion receptors of the immune system.** Nature 1990;346:425-34
223. Springer TA. **Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm.** Cell 1994;76:301-14
224. Steinbauer M, Harris AG, Messmer K. **Effects of dextran on microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle.** Am J Physiol 1997;272:1710-6
225. Steinhausen M, Zimmerhackl B, Thederan H, Dussel R, Parekh N, Eßlinger H-U, von Hagens G, Komitowski D, Dallenbach FD. **Intraglomerular microcirculation: Measurements of single glomerular loop flow in rats.** Kidney Int 1981;20:230-9
226. Stenberg PE, McEver RP, Shuman MA, Jacques YV, Bainton DF. **A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation.** J Cell Biol 1985; 101:880-6

227. Stevens CR, Blake DR, Merry P, Revell PA, Levick JR. **A comparative study by morphometry of the microvasculature in normal and rheumatoid synovium.** Arthritis Rheum 1991;34:1508-13
228. Stoerh HC, Bielinski TC, Budzilovich T. **Chronic polyarthritis in rats injected with spleen in adjuvants.** Am J Pathol 1954;30:616-21
229. Storgard CM, Stupnick DG, Jonczyk A, Goodman SL, Fox RI, Cheresch DA. **Decreased angiogenesis and arthritic disease in rabbits treated with an alphavbeta3 antagonist.** J Clin Invest 1999;103:47-54
230. Stuart JM, Cremer MA, Townes AS, Kang AH. **Type II collagen-induced arthritis in rats. Passive transfer with serum and evidence that IgG anticollagen antibodies can cause arthritis.** J Exp Med 1982;155:1-16
231. Stuart JM and Dixon FJ. **Serum transfer of collagen-induced arthritis in mice.** J Exp Med 1983;158:378-92
232. Svensson L, Jirholt J, Holmdahl R, Jansson L. **B-cell deficient mice do not develop type II collagen-induced arthritis (CIA).** Clin Exp Immunol 1998;111:521-6
233. Svensson L, Nandakumar KS, Johansson A, Jansson L, Holmdahl R. **IL-4-deficient mice develop less acute but more chronic relapsing collagen-induced arthritis.** Eur J Immunol 2002;32:2944-53
234. Szanto S, Gal I, Gonda A, Glant TT, Mikecz K. **Expression of L-selectin, but not CD44, is required for early neutrophil extravasation in antigen-induced arthritis.** J Immunol 2004;172:6723-34
235. Szekanecz Z, Koch AE. **Update on synovitis.** Curr Rheumatol Rep 2001;3:53-63
236. Taggart CC, Greene CM, McElvaney NG, O'Neill S. **Secretory leucoprotease inhibitor prevents lipopolysaccharide-induced I κ B α degradation without effecting phosphorylation or ubiquitination.** J Biol Chem 2002;277:33648-53
237. Taggart CC, Cryan SA, Weldon S, Gibbons A, Greene CM, Kelly E, Low TB, O'Neill SJ, McElvaney NG. **Secretory leucoprotease inhibitor binds to NF- κ B binding sites in monocytes and inhibits p65 binding.** J Exp Med 2005;202:1659-68
238. Tak PP, Turkow EW, Daha MR, Kluin PM, Smeets TJM, Meinders AE, Breedveld FC. **Expression of adhesion molecules in early rheumatoid synovial tissue.** Clin Immunol Immunopathol 1995;77:236-42
239. Tak PP, Taylor PC, Breedveld FC, Smeets TJ, Daha MR, Kluin PM, Meinders AE, Maini RN. **Decrease in cellularity and expression of adhesion molecules by anti-tumor**

- necrosis factor alpha monoclonal antibody treatment in patients with rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 1996;39:1077-81
240. Tapalaga D, Tiegs G, Angermüller S. **NFkappaB and caspase-3 activity in apoptotic hepatocytes of galactosamine-sensitized mice treated with TNFalpha.** *J Histochem Cytochem* 2002;50:1599-609
241. Tarkowski A, Klareskog L, Carlston H, Herberts P, Koopman WJ. **Secretion of antibodies to types I and II collagen by synovial tissue cells in patients with rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 1989;32:1087-92
242. Taub DD. **Chemokine-leukocyte interactions. The voodoo that they do so well.** *Cytokine Growth Factor Rev* 1996;7:355-76
243. Taylor PC, Peters AM, Paleolog E, Chapman PT, Elliott MJ, McCloskey R. **Reduction of chemokine levels and leukocyte traffic to joints by tumor necrosis factor alpha blockade in patients with rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 2000; 43:38-47
244. Terato K, Shimozuru Y, Katayama K, Takemitsu Y, Yamashita I, Miyatsu M, Fujii K, Sagara M, Kobayashi S, Goto M. **Specificity of antibodies to type II collagen in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 1990;33:1493-500
245. Terato K, Hasty KA, Reife RA, Cremer MA, Kang AH, Stuart JM. **Induction of arthritis with monoclonal antibodies to collagen.** *J Immunol* 1992;148:2103-8
246. Terato K, Harper DS, Griffiths MM, Hasty DL, Ye XJ, Cremer MA, Seyer JM. **Collagen-induced arthritis in mice: synergistic effect of E. coli lipopolysaccharide bypasses epitope specificity in the induction of arthritis with monoclonal antibodies to type II collagen.** *Autoimmunity* 1995;22:137-47
247. Thomas R, Carroll GJ. **Reduction of leukocyte and interleukin-1 beta concentrations in the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate.** *Arthritis Rheum* 1993; 36:1244-52
248. Thompson RC, Ohlsson K. **Isolation, properties and complex amino acid sequence of human secretory leukocyte proteinase inhibitor, a potent inhibitor leukocyte elastase.** *Proc Nat Acad Sci USA* 1986;83:6692-6
249. Thompson RD, Noble KE, Larbi KY, Dewar A, Duncan GS, Mak TW, Nourshargh S. **Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1)-deficient mice demonstrate a transient and cytokine-specific role for PECAM-1 in leukocyte migration through the perivascular basement membrane.** *Blood* 2001;97:1854-60

250. Tillmanns H, Neumann FJ, Tiefenbacher C, Dorigo O, Parekh N, Waas W, Zimmermann R, Steinhausen M, Kuebler W. **Activation of neutrophils in the microvasculature of the ischaemic and reperfused myocardium.** Eur Heart J 1993;14:82-6
251. Tomee JF, Hiemstra PS, Heinzl-Wieland R, Kauffman HF. **Antileukoprotease: an endogenous protein in the innate mucosal defense against fungi.** J Infect Dis 1997;176:740-7
252. Trentham DE, Townes AS and Kang AH. **Autoimmunity to type II collagen: an experimental model of arthritis.** J Exp Med 1977;146:857-68
253. Trentham DE. **Collagen arthritis as a relevant model for rheumatoid arthritis.** Arthritis Rheum 1982;25:911-6
254. Tuls J, Geren L, Millett F. **Fluorescein isothiocyanate specifically modifies lysine 338 of cytochrome P-450_{scc} and inhibits adrenodoxin binding.** J Biol Chem 1989;264:16421-5
255. Unkeless JC, Scigliano E, Freedman VH. **Structure and function of human and murine receptors of IgG.** Annu Rev Immunol 1988;6:251-81
256. Vestweber D, Blanks JE. **Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands.** Physiol Rev 1999;79:181-213
257. Veihelmann A, Szczesny G, Nolte D, Krombach F, Refior HJ, Messmer K. **A novel model for the study of microcirculation in the mouse knee joint in vivo.** Res Exp Med 1998;198:43-54
258. Veihelmann A, Harris AG, Krombach F, Schütze E, Refior HJ, Messmer K. **In vivo assesment of synovial microcirculation and leukocyte-endothelial cell interaction in mouse Antigen-induced arthritis.** Microcirculation 1999;6:281-90
259. Vestweber D. **Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium.** Immunol Rev 2007;218:178-96
260. Villringer A, Haberl RL, Dirnagl U, Anneser F, Verst M, Einhüpl KM. **Confocal laser microscopy to study microcirculation on the rat brain surface in vivo.** Brain Res 1989;504:159-60
261. Vollmar B, Conzen PF, Kerner T, Habazettl H, Vierl M, Waldner H, Peter K. **Blood flow and tissue oxygen pressures of liver and pancreas in rats: effects of volatile anesthetics and of hemorrhage.** Anesth Analg 1992;75:421-30
262. Vollmar B, Lang G, Post S, Menger MD, Messmer K. **Microcirculation of the liver in hemorrhagic shock in the rat and its significance for energy metabolism and function.** Zentralbl Chir 1993;118:218-25

263. Vollmar B, Preissler G, Menger MD. **Hemorrhagic hypotension induces arteriolar vasomotion and intermittent capillary perfusion in rat pancreas.** Am J Physiol 1994;267:1936-40
264. Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD. **Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant for liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion.** Am J Pathol 1994b;145:1421-31
265. Vollmar B, Conzen P, Habazettl H, Adili F, Peter K: **Does nitrous oxide affect coronary microcirculation? An intravital microscopic study in the canine heart.** Anesth Analg 1995;80:249-55
266. Vollmar B, Rüttinger D, Wanner GA, Leiderer R, Menger MD. **Modulation of Kupffer cell activity by gadolinium chloride in endotoxemic rats.** Schock 1996;6:434-41
267. Wakelin MW, Sanz MJ, Dewar A, Albeda SM, Larkin SW, Boughton-Smith N, Williams TJ, Nourshargh S. **An anti-platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 antibody inhibits leukocyte extravasation from mesenteric microvessels in vivo by blocking the passage through the basement membrane.** J Exp Med 1996;184:229-39
268. Ward PA, Seekamp A, Mulligan MS. **In vivo relationship between cytokines and adhesion molecules.** Intensiv Care Med 1994;20:20-5
269. Wilder RL. **Streptococcal cell-wall-induced Arthritis in rats: an overview.** Int J Tissue React 1988;10:1-5
270. Willbuger RE, Müller K, Knorth H. **Pharmakologische Therapie der rheumatoiden Arthritis.** Deutsches Ärzteblatt 2006;103:48-57
271. Wooley PH, Luthra HS, Stuart JM, David CS. **Type II collagen-induced arthritis in mice. Major histocompatibility complex (I region) linkage and antibody correlates.** J Exp Med 1981;54:688-700
272. Wooley PH, Luthra HS, Singh SK, Huse AR, Stuart JM, David CS. **Passive transfer of arthritis to mice by injection of human anti-type II collagen antibody.** Mayo Clin Proc 1984;59:737-43
273. Wooley PH, Luthra HS, Griffiths MM, Stuart JM, Huse A, David CS. **Type II collagen-induced arthritis in mice. IV. Variations in immunogenetic regulation provide evidence for multiple arthritogenic epitopes on the collagen molecule.** J Immunol 1985;135:2443-51
274. Wotorek W, Farlay D, Salvesen G, Travis J. **Neutrophil elastase and cathepsin G: structure, function, and biological control.** Adv Exp Med Biol 1988;240:23-31
275. Wright M. **Pharmakologic effects of ketamine and its use in veterinary medicine.** J Am Vet Med Assoc 1982;180:1462-71

276. Xia C, Ghosh S. **NF- κ B, an evolutionarily conserved mediator of immune and inflammatory responses.** Adv Exp Med Biol 2005;560:41-5
277. Yadav R, Larbi KY, Young RE, Nourshargh S. **Migration of leukocytes through the vessel wall and beyond.** Thromb Haemost 2003;90:598-606
278. Yoo TJ, Kim SY, Stuart JM, Floyd RA, Olson GA, Cremer MA, Kang AH. **Induction of arthritis in monkeys by immunization with type II collagen.** J Exp Med 1988;168:777-82
279. Zahler S, Heindl B, Becker BF. **Ketamine does not inhibit inflammatory responses of cultured human endothelial cells but reduces chemotactic activation of neutrophils.** Acta Anaesthesiol Scand 1999;43:1011-26
280. Zeeuwen PL, Hendriks W, de Jong WW, Schalkwijk J. **Identification and sequence analysis of two new members of the SKALP/elafin and SPAI-2 gene family. Biochemical properties of the transglutaminase substrate motif and suggestions for a new nomenclature.** J Biol Chem 1997;272:20471-8
281. Zhang Y, DeWitt DL, McNeely TB, Wahl SM, Wahl LM. **Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses the production of monocyte prostaglandin H synthase-2, prostaglandin E2, and matrix metalloproteinase.** J Clin Invest 1997;99:894-900
282. Zweifach BW. **Direct observation of the mesenteric circulation in experimental animals.** Anat Rec 1954;120:277-91
283. Zweifach BW. **The microcirculation in the intestinal mesentery.** Microvas Res 1973;5:363-7
284. Zwissler B, Schosser R, Weiss C, Iber V, Weiss M, Schwickert C, Spengler P, Messmer K. **Methodological error and spatial variability of organ blood flow measurements using radiolabeled microspheres.** Res Exp Med 1991;191:47-63

8. Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Anja Erichson, geb. Kühl
Geburtsdatum	18.02.1981
Geburtsort	Rostock
Nationalität	deutsch
Familienstand	verheiratet

SCHULISCHER WERDEGANG

1987 - 1991	Grundschule, Rostock
1991 - 1999	Gymnasium Reutershagen, Rostock
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

HOCHSCHULBILDUNG

1999 - 2006	Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock
2001	Ärztliche Vorprüfung
2002	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2005	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2006	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

PRAKTISCHES JAHR

Innere Medizin	Universität Rostock, Abt. Hämatologie und Onkologie Irland, Portiuncula Hospital, Cardiology
Chirurgie	Schweiz, Kantonsspital Obwalden, FMH Allgemein-/ Viszeralchirurgie und Traumatologie
Strahlentherapie	Universität Rostock, Zentrum für Strahlentherapie Radiologische Diagnostik

BERUFLICHE TÄTIGKEITEN

Seit September 2006 Assistenzärztin der Inneren Medizin, MediClin Müritz-Klinikum Waren

WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEITEN

Seit 3/2003 Promotion am Institut für Experimentelle Chirurgie, Medizinische Fakultät der Universität Rostock (Direktor: Frau Prof. Dr. Brigitte Vollmar)

Teile dieser Arbeit wurden in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Sehnert B, Gierer P, Ibrahim S, Kühl A, Voll R, Nandakumar KS, Holmdahl R, Hallmann R, Vollmar B, Burkhardt H. **Modulation of granulocyte-endothelium interactions by antileukoproteinase: inhibition of anti-type II collagen antibody-induced leukocyte attachment to the synovial endothelium.** Arthritis Res Ther 2006;8:R95

Kongreßbeitrag:

Gierer P, Kühl A, Ibrahim S, Burkhardt H, Sehnert B, Holmdahl R, Nandakumar KS, Mittlmeier T, Vollmar B. **Antileukoproteinase reduziert die zelluläre Entzündungsreaktion nach anti-Kollagen II Antikörper induzierter rheumatoider Arthritis in einem Tiermodell der Maus.** 122. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, Chirurgisches Forum München 2005. Chir Forum 2005;34:347-348

9. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar am Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock angefertigt. Ich danke ihr herzlich für die wertvollen Ratschläge, die lehrreiche Kritik, die stete Bereitschaft zur wissenschaftlichen Diskussion, und großzügige Unterstützung zu jeder Zeit.

Mein besonderer Dank gilt Dr. med. Philip Gierer für die unkomplizierte Betreuung meiner Arbeit, die schnelle Einarbeitung in die mikrochirurgischen Techniken, stetige Motivation und Unterstützung bei kleineren und größeren Problemen.

Weiterhin danke ich allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Chirurgie für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die stetige Hilfsbereitschaft. Ein großes Dankeschön an Dorothea Frenz, Berit Blendow, Doris Butzlaff, Maren Nerowski, Claudia Vergien, Anja Gellert und Dr. rer. nat. Christian Eipel. Kathrin Sievert danke ich besonders für die fingerfertige Unterstützung während der experimentellen Untersuchungen. Des weiteren danke ich Karin Gerber und Reinhard Schwärmer für die Aufzucht und Betreuung der für diese Arbeit notwendigen Tiere.

Danken möchte ich außerdem Dr. med. Harald Burckhardt und Dr. med. Saleh Ibrahim für die gute Kooperation, Hilfe bei der Entwicklung der Thematik sowie Bereitstellung und Anfertigung der Antikörperaliquots und ALP-Chargen.

Ganz herzlichen Dank für die Hilfe bei PC- und Formatierungsproblemen an Anke Wellner und Dr. med. Gabriel Burrows. Für den stetigen Zuspruch, motivierende Worte und vor allem die nötige Ablenkung danke ich im besonderen Johanna Siegert.

Mein größter Dank gilt meinem Mann Ronny Erichson, meiner Familie und ganz besonders meinen Eltern, Ihnen sei diese Arbeit gewidmet. Ich danke Euch für den Rückhalt, den Freiraum, aufbauende und antreibende Worte sowie die unermüdliche und selbstverständliche Unterstützung in allen Lebenslagen.

Anja Erichson

Thesen zur Dissertation

In vivo Analyse der synovialen Mikrozirkulation- Charakterisierung und Einfluß von Antileukoproteinase nach Arthritisinduktion in der Maus

1. Die rheumatoide Arthritis (RA) ist mit einer Prävalenz von ca. 1-2% die häufigste chronisch entzündliche Gelenkerkrankung. Durch den chronischen Charakter und die fehlenden kurativen Behandlungsmöglichkeiten schreitet die Arthritis voran und führt in schweren Verlaufsformen bereits nach kurzer Dauer zu Invalidität und Arbeitsunfähigkeit des Betroffenen. Die Mortalität ist bei der rheumatoiden Arthritis 2 bis 3-mal höher als bei der Normalbevölkerung.
2. Ätiologie und Pathogenese der rheumatoiden Arthritis sind trotz intensiver Forschung bislang weitgehend unbekannt. Es existieren jedoch verschiedene Hypothesen. Neben einer gestörten Autoimmunität werden eine zur Krankheitsdisposition beitragende erbliche Komponente aber auch mögliche exogene Faktoren diskutiert.
3. Die Entzündung der Synovialis ist der Schlüsselpunkt der Pathogenese. Dabei nimmt die synoviale Mikrozirkulation und im Besonderen das Gefäßendothel durch die Funktionen der Zytokinproduktion, Antigenpräsentation sowie Leukozyten-rekrutierung eine zentrale Stellung ein.
4. Ein besseres detailliertes und mechanistisches Verständnis zur Initiation der rheumatoiden Arthritis ist die Voraussetzung für die Entwicklung neuer effizienter Therapieansätze.
5. Das Modell der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) sowie der Anti-Kollagen II Antikörper-induzierten Arthritis (CAIA) sind zwei in der Kinetik sich unterscheidende, viel genutzte Tiermodelle zur rheumatoiden Arthritis. Mittels hochauflösender Multifluoreszenz-Mikroskopie kann die synoviale Mikrozirkulation des Kniegelenkes in beiden Arthritismodellen gut visualisiert und analysiert werden.

Dabei wird sowohl die Mikrohämodynamik als auch die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion beurteilt.

6. Die Antileukoproteinase (ALP) ist ein säurestabiles, zysteinreiches Protein. ALP ist ein physiologischer Inhibitor der leukozytären Serinproteinasen und spielt eine wichtige Rolle bei der Gewebeprotektion. ALP akkumuliert präferentiell im Gelenkknorpel und nimmt, neben den anti-proteolytischen Fähigkeiten, auf eine Vielzahl anti-inflammatorischer Prozesse in Monozyten und Neutrophilen positiven Einfluss.
7. Die vorliegende in vivo Studie konnte eindrucksvoll die Entzündungsreaktion der synovialen Kniegelenksschleimhaut noch vor dem Auftreten klinisch erfassbarer, arthritischer Gelenkveränderungen zeigen. In den für Arthritis suszeptiblen Mausstämmen (TCR, DBA1/J) trat nach Arthritisinduktion eine massive zelluläre Immunantwort mit gesteigerter Leukozyten-Endothelzell-Interaktion auf.
8. Die Applikation von ALP führte in der frühen Arthritisphase zu einer effektiven Hemmung der synovialen Entzündungsreaktion. Verglichen mit Kontrolltieren, die eine äquivalente Dosis PBS erhielten, war die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in den ALP-behandelten Mäusen signifikant reduziert. Der blockierende Effekt von ALP auf die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion bezog sich sowohl auf das Rolling als auch auf die feste Adhäsion der Zellen.
9. Das Rolling wird als Selektin-abhängige Interaktion der Leukozyten mit dem mikrovaskulären Endothel definiert. Die ALP-vermittelte Hemmung des Rollings steht im engen Zusammenhang mit der Zytokinsignalkaskade in endothelialen Zellen. ALP reduziert die IL-1 β -bedingte Hochregulation von E-Selektin. Dies ist durch eine ALP-vermittelte Suppression der IL-1 β -induzierten NF- κ B Aktivierung zu erklären. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B mit Translokation in den Zellkern ist von entscheidender Bedeutung bei der Leukozytenrekrutierung. So induziert NF- κ B die Expression zahlreicher Adhäsionsmoleküle und die Freisetzung inflammatorischer Mediatoren.

10. Neben der Interaktion mit der NF- κ B Signalkaskade ist die blockierende Wirkung von ALP auf die Leukozytenextravasation eng mit der β 2-Integrinaktivierung auf Leukozyten verknüpft. Die Beteiligung von ALP an Immunkomplex-induzierten inflammatorischen Signalkaskaden basiert unter anderem auf der FcR-induzierten Reorganisation des Actin-Zytoskeletts. Die ALP-vermittelte Suppression der Konformationsänderung des Zytoskeletts führt zu einer verminderten Oberflächenexpression aktivierter β 2-Integrine auf Granulozyten. Das Resultat ist eine verminderte Interaktion und damit eine reduzierte Adhäsion der Leukozyten am aktivierten Endothel.

11. Die Inhibition der mikrovaskulären Leukozytenadhärenz könnte für die Reduktion der Leukozyteninfiltration ins Gewebe und Chemokinfreisetzung verantwortlich und damit für die Reduktion des konsekutiven Gewebeschadens von wichtiger, therapeutischer Bedeutung sein. Es ist durchaus denkbar, dass sich der Krankheitsverlauf bei der rheumatoiden Arthritis durch das breite anti-proteolytische und anti-inflammatorische Wirkprofil von ALP positiv beeinflussen lässt.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt worden ist. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Rostock, den 28.12.2009

Anja Erichson